

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

PAR

Marc FERRIER

Pharmacien

*Ex-moniteur de Sciences Physiques
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

né à Mâcon, le 15 Mai 1903

Contribution à l'Étude d'une Méthode d'imprégnation argentique pour la différenciation des Bactéries vivantes et des Bactéries mortes

Soutenue le 25 Février, devant la Commission d'Examen

Président MM. LASSEUR

Juges { VERNIER
MARCHAL

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1939

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

PAR

Marc FERRIER

Pharmacien

*Ex-moniteur de Sciences Physiques
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

né à Mâcon, le 15 Mai 1903

Contribution

à l'Étude d'une Méthode d'imprégnation argentique
pour la différenciation des Bactéries vivantes
et des Bactéries mortes

Soutenue le 25 Février, devant la Commission d'Examen.

Président..... MM. LASSEUR

Juges..... { VERNIER
MARCHAL

NANCY

SOCIÉTÉ D'IMPRESSIONS TYPOGRAPHIQUES

1939

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen:

M. F. KAYSER

Assesseur:

M. A. MEUNIER

Doyens honoraires:

M. BRUNTZ, C ✱, ✱, I ✱, O ✱, ✱, ✱, Recteur de l'Université de Nancy.
M. SEYOT, ✱, ✱, I ✱, ✱, ✱, Professeur d'Histoire naturelle

Professeurs honoraires:

M. GRÉLOT, ✱, I ✱, ✱.
M. BRUNTZ, C ✱, ✱, I ✱, O ✱, ✱, ✱.

Professeurs:

MM. DOURIS, I ✱, ✱, ✱ Toxicologie.
PASTUREAU, O ✱, I ✱, ✱ Pharmacie chimique.
SEYOT, ✱, ✱, I ✱, ✱, ✱ Histoire naturelle.
LASSEUR, ✱, I ✱, ✱ Microbiologie.
MEUNIER Pharmacie galénique.
Mlle M.-Th. FRANÇOIS Matière médicale.
M. KAYSER Chimie.

Maître de Conférences

M. MARCHAL Sciences naturelles.

Agrégé libre:

M. GIRARDET, ✱, I ✱ Chimie et Toxicologie.

Chargés de cours:

M. SEYOT, ✱, ✱, I ✱, ✱, ✱, Pr. Cryptogamie.
Mlle M.-Th. FRANÇOIS, professeur.. Hygiène.
MM. KAYSER, professeur..... Chimie minérale.
DONZELOT, ✱, Pr Fac. Sciences Physique.
SIMONNET, I ✱, Pr Fac. Droit. Déontologie.
MARCHAL, maître de conférences. Hydrologie.
VERNIER, I ✱ Zoologie.
CORDEBARD, ✱, ✱, I ✱ Analyse chimique.
STEIMETZ, ✱ Minéralogie.
RICHARD Chimie organique.



Chefs de travaux:

MM. VERNIER, I ✱ Microbiologie et Parasitologie.
CORDEBARD, ✱, ✱, I ✱ Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ, ✱ Micrographie.
DONZELOT, ✱ (chargé de trav.). Physique.
RICHARD (chargé de travaux) ... Pharmacie.
BAILLY (chargé de travaux) Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat:

M. TRIBOLET, I ✱ Secrétaire.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

A CEUX QUI ME SONT CHERS

MEIS ET AMICIS

AVANT-PROPOS

En présentant ce travail, je me fais un devoir de dire toute ma reconnaissance aux Maîtres qui m'ont aidé ou encouragé à le mener à bien.

J'adresse tout d'abord un hommage à la mémoire de Monsieur le Professeur A. DE CEDERKREUTZ qui, alors qu'il était Professeur à l'Ecole de Médecine d'Helsingfors (Finlande) m'a procuré un texte indispensable, mais introuvable en France.

Ma reconnaissance va à Monsieur le Professeur PILLOT qui m'a choisi, comme moniteur, pour collaborer avec lui au Laboratoire de Physique, au cours de ma scolarité. Grâce à cet emploi, j'ai appris à moins craindre et à plus aimer mes Maîtres; j'ai aimé la recherche; j'ai pris confiance en moi.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur et Madame LASSEUR qui, avec patience et bonté, m'ont constamment dirigé et encouragé. Durant les dix années qu'il m'a fallu pour terminer ce travail, autant de fois j'ai été découragé, autant de fois ils m'ont remis sur le bon chemin.

Je remercie Monsieur MARCHAL, Maître de conférence et Monsieur le Docteur VERNIER, près de qui j'ai toujours trouvé le bon conseil et qui ont bien voulu examiner mon travail.

INTRODUCTION

Expériences de Nyfeldt et de Cederkrentz

« La question de pouvoir identifier sur une lame une Bactérie morte
« d'une Bactérie vivante est des plus intéressantes et permettrait de
« trancher beaucoup de questions jusqu'ici en suspens, par exemple celle-
« ci très discutée : les formes non acido-résistantes du Bacille de la lèpre
« sont-elles vivantes ou mortes ? » (1) [CEDERKREUTZ].

Jusqu'à présent aucune méthode sûre ne permettait d'affirmer qu'une Bactérie fixée sur une lame était vivante ou morte avant la fixation ; les méthodes indiquées à cet effet par UNNA ont été en général accueillies avec scepticisme.

JAMAMOTO (2) a constaté que les Bacilles tuberculeux mis en contact, pendant 10 minutes, avec une solution à 5 % de nitrate d'argent à la température de 55° C. et développés dans un bain réducteur (acide pyrogallique 2 % et acide tannique 1 %) sont colorés en noir tandis que dans les mêmes conditions le Bacille de la lèpre ne l'est pas.

Ce sujet a été étudié par Aage NYFELDT qui voit dans le procédé d'imprégnation argentique un moyen efficace de différenciation. Voici l'extrait que donne *Arkiv för inhre Medicin* :

Différence d'affinité à l'argent entre les bactéries vivantes et les bactéries mortes

« Dans une occasion où ma peau fut noircie par du nitrate d'argent,
« il me vint à la pensée que ce noircissement, qu'il soit occasionné par
« du nitrate d'argent aussi bien en solution que sous forme solide on en

(1) CEDERKREUTZ. — *Arkiv för inhre Medicin*, Band 51, Heft 3. « Nicht alle toten Bakterien sind Ag. positiv. »

(2) JAMAMOTO. — Eine Silberimprägnationsmethode zur Unterscheidung, von Lepra und Tuberkelbacillen. *Centralblatt für Bakteriologie*, I Original, t. XLVII, 8 septembre 1908, pp. 570 à 611.

« pouvait déduire que les cellules étaient mortes, car ce noircissement ne
« s'explique pas entièrement photochimiquement, en effet il se produit
« aussi à l'obscurité.

« J'ai fait alors un étalement d'une culture âgée de 2 semaines du *Micrococcus pyogenes albus* et je l'ai laissé 24 heures à 37° C. dans une
« solution de nitrate d'argent à 5 %. Ensuite j'ai développé la prépara-
« tion dans un bain ordinaire de Métol-hydroquinone et, à l'examen mi-
« crosopique, j'ai obtenu ce que montre la figure III, c'est-à-dire un mé-
« lange de cocci « Ag-négatifs » et de cocci « Ag-positifs ». Une culture
« en bouillon (24 heures) et une culture sur gélose me montrèrent la rai-
« son de l' « Ag-positivisme » et de l' « Ag-négativisme », car avec une
« préparation de culture en bouillon qui a été soumise à la chaleur 10
« minutes et après la stérilisation ne donnant pas de développement sur
« gélose et en bouillon, j'ai obtenu la figure I, c'est-à-dire seulement des
« cocci « Ag-positifs », par contre une culture sur gélose de 24 heures
« donnait ce que montre la figure II, même à certains endroits sans un
« seul coccus « Ag-négatif ».

« Les préparations ont été obtenues de la même façon. J'ai fait alors
« 50 préparations des deux types pour me confirmer l'absence du hasard,
« toutes montraient les figures n° I pour les cultures mortes, n° II pour
« les cultures vivantes.

« Je continuai des recherches analogues avec les Bactéries suivantes :

Micrococcus pyogenes aureus;

Streptococcus pyogenes;

Bacterium coli;

Bacterium muri septicum;

Spir. metschnikowi.

« En dehors de la stérilisation (5 minutes à 100° C.), j'ai employé les
« procédés suivants :

Chaleur à 70° C. (1 heure);

Vapeur de formol (24 heures);

Vapeur d'éther (24 heures);

Oxydol 3 % (24 heures);

Solution de sublimé 1 % (24 heures);

« et j'ai vérifié après cette action que les cultures étaient stériles (gélose
« inclinée, bouillon).

« J'ai trouvé alors que **toutes les Bactéries mortes sont « Ag positives », toutes celles qui sont vivantes sont « Ag négatives ».**

« Ma technique était la suivante :

- 1) Etaler et sécher;
- 2) Fixation à la flamme et lavage 10 minutes à l'eau distillée;
- 3) 24 heures dans NO^3Ag à 5 %;
- 4) Développement et rinçage (3);
- 5) Coloration par contraste avec le rouge neutre.

« Dans une préparation de gonocoque d'urétrite frais, non traité, j'ai trouvé des gonocoques en partie extra et intracellulaires « Ag-positifs », partie extra et intracellulaires « Ag-négatifs ».

« Après injection des Streptocoques tués (« Ag-positifs ») dans le péritoine d'un lapin, je n'ai trouvé après 24 heures, dans une préparation de l'humeur, que des cocci « Ag-positifs ».

« Comme conclusion je me fais un devoir d'adresser mes remerciements à M. le Professeur Docteur C.-J. SALOMONSEN pour le matériel de Bactériologie mis à ma disposition, pour les bons conseils qu'il m'a donnés et pour l'intérêt qu'il a pris à mon travail » (4).

A cette étude, le baron Axel DE CEDERKREUTZ, Professeur à l'Université d'Helsingfors opposa celle qu'il en fit et dont les conclusions ne sont pas conformes à celles de NYFELDT :

Les bactéries mortes ne sont pas toutes « Ag positives »

« En 1917 Aage NYFELDT a publié (5) ses recherches sur l'affinité des différentes Bactéries vis-à-vis de l'argent et est arrivé à la conclusion que toutes les Bactéries mortes sont « Ag-positives », toutes les Bactéries vivantes (c'est-à-dire vivantes avant la fixation) « sont Ag-négatives ».

(3) Métol.	2 g.
Sulfite de soude.	85 g.
Hydroquinone.	5 g.
Carbonate de soude.	40 g.
Bromure de sodium.	2 g.
Eau distillée.	1.000 g.

(4) Aage NYFELDT. — *Arkiv för inhre Medicin*. H. 1-2; S. 184; 1917.

(5) *Arkiv för inhre Medicin*. Band 51, Heft 3, Nicht alle toten Backterien sind Ag-positiv. Axel de CEDERKREUTZ.

« Si ce fait était exact, on aurait, dans l'absence d'affinité pour l'argent, un critère de vie et de force vitale d'une plastide et on pourrait trancher à l'aide de la méthode argentique beaucoup de questions jusqu'ici en suspens, par exemple la question si discutée. les formes non acido-résistantes du Bacille de la lèpre sont-elles vivantes ou mortes? Jusqu'ici on n'est pas arrivé à trouver une méthode de coloration permettant de différencier les germes morts des germes vivants: les méthodes indiquées à cet effet par UNNA ont été accueillies en général avec un scepticisme qui me paraît justifié. Chez les Bactéries, la vie et la colorabilité ne sont pas toujours étroitement liées.

« J'ai fait en 1900 l'étude biologique et morphologique d'un coccus polymorphe, hôte habituel et parasite de la peau humaine, « Gram positif » ressemblant au gonocoque. J'ai observé que ce coccus dans certaines conditions produit des formes qui, quoique mortes et incapables de reproduction, se laissent bien et distinctement colorer par les colorants habituels. En employant du bleu de méthylène polychrome et en décolorant avec une solution concentrée aqueuse de tanin, j'obtiens de belles préparations.

« Les formes en question apparaissent dans les cultures sur gélose glucosée à 5 %. Les germes y gardent leur colorabilité, même après leur mort qui arrive dans les cultures séjournant de 10-15 jours au thermostat. Dans ces cultures, dont on ne peut enlever les germes qu'avec de l'eau stérile, tous les germes se colorent aussi parfaitement que ceux d'une jeune culture. Et pourtant les cocci de la culture de 15 jours sont sûrement morts, mais ils paraissent subir sur la gélose glucosée une sorte de conservation qui fait qu'ils gardent leur forme et leur colorabilité après la mort.

« J'ai examiné comment ces germes morts conservés se comportent vis-à-vis de l'imprégnation à l'argent en suivant la technique de NYFELDT. Il s'est montré que les cocci de ces cultures sont « Ag-négatifs » pour la plus grande partie. Dans quelques préparations il y a bien quelques germes isolés imprégnés d'argent, mais j'admets qu'ils proviennent de la culture-mère poussée sur gélose ordinaire ou qu'ils sont couverts de gélose glucosée qui est « Ag-positive ». Leur présence en petit nombre est donc insignifiante et prouve seulement que l'imprégnation et le développement ont été bien faits, ce dont je me suis aussi convaincu par des expériences de contrôle faites sur des préparations provenant de culture

« sur gélose ordinaire. Par contre, on peut voir nettement sur mes prépa-
« rations faites avec des cultures sur gélose glucosée que la plus grande
« partie de leurs germes, sûrement morts, ne se laissent pas imprégner
« par l'argent. C'est pourquoi j'ose prétendre que l'affinité négative pour
« l'argent n'est pas un critère certain de la vie et de la reproductivité
« d'un germe. »

C'est dans cet état de la question que M. le Professeur LASSEUR, de la Faculté de Pharmacie de Nancy, me demanda d'apporter ma contribution personnelle à cette étude. Je n'ai pas la prétention de faire jaillir beaucoup de lumière par ce modeste travail auquel j'ai apporté toute ma bonne volonté, malheureusement trop limitée par l'exercice de ma profession de pharmacien. En effet, j'ai entrepris cette étude après mon installation dans une petite pharmacie de campagne et je n'ai disposé, ni d'un matériel abondant, ni de beaucoup de loisirs, ce qui explique qu'il m'a fallu près de dix ans pour la mener à bien.



CHAPITRE PREMIER

Généralités sur les méthodes d'imprégnation argentique

Je donnerai tout d'abord un aperçu des principaux procédés d'imprégnation argentique, puis j'exposerai mes recherches personnelles.

Jusqu'à ces temps derniers, il n'existait aucune méthode sûre pour différencier, sur une lame, les Bactéries vivantes des Bactéries mortes avant la fixation.

« SEIFFERT (1) cependant a constaté au cours d'expériences antérieures
« (*Berl. Klin. Woch.*, p. 873, 1921) une différence marquée de perméa-
« bilité des cellules bactériennes vivantes et mortes vis-à-vis des colo-
« rants en milieu protéique. Il rapporte, dans le travail actuel, les essais
« faits pour trouver une technique qui permettrait de cette façon la dif-
« férenciation des Bactéries mortes et vivantes. Les colorants étudiés
« n'ont pas permis d'élaborer une méthode générale susceptible d'être
« appliquée aux différents germes. Il a eu alors recours à l'emploi du
« rouge congo: seules les Bactéries tuées se laissent colorer par cette
« substance, les germes vivants restent incolores et même au bout de 24
« heures » (E. WOLLMANN).

IMPRÉGNATION A L'ARGENT

Ces méthodes sont très nombreuses et il serait tout à fait inutile de les rappeler toutes. Je trouve cependant utile d'en résumer quelques-unes, pensant pouvoir me servir de considérations générales sur ces méthodes

(1) W. SEIFFERT. — Vergleichende Farbenversuche an lebenden und toten Bakterien (Recherches comparées sur la coloration de Bactéries vivantes et mortes). *Centralblatt für Bakteriologie* I, t. LXXXVIII, p. 151, 1922.

pour juger celle que propose NYFELDT, afin de différencier les Bactéries mortes et vivantes.

Pour ces imprégnations à l'argent, trois formes de ce métal sont utilisées; le nitrate d'argent, le carbonate d'argent et un complexe ammoniacal d'argent.

Méthode de Ramon-G. CAJAL

Les méthodes au nitrate d'argent dérivent de celle qu'a tout d'abord indiquée Ramon-G. CAJAL (2). Ce savant, à lui seul, a proposé plus de 30 modalités de cette méthode. Le principe restait le même alors que variait surtout le procédé de fixation des préparations. Après fixation, soit par l'alcool ammoniacal, soit par le chloral, soit par le nitrate d'uranium, soit par le nitrate de cobalt, Ramon-G. CAJAL fait imprégner ses préparations dans une solution de nitrate d'argent à 1,5 pour 100, soit à la température ordinaire, soit à 37° C., procède à un lavage et ensuite fait opérer la réduction par l'acide pyrogallique ou l'hydroquinone.

Méthode de JALMEL (3)

JALMEL, lui, fait imprégner ses préparations à 37° C. et à l'obscurité. Il procède au lavage également à l'obscurité, ainsi qu'à la réduction qu'il conseille de faire avec un bain renfermant: acide pyrogallique 4 %, formol 5 %.

Méthode de BALBUENA (4)

BALBUENA verse 20 cm³ de solution de nitrate d'argent à 1 pour 2.000 et 5 à 6 gouttes de pyridine sur la lame fixée. La préparation est chauffée jusqu'à émission de vapeur; après refroidissement, l'auteur ajoute quelques gouttes de teinture alcoolique de succin pour établir un milieu

(2) RAMON (S.) et CAJAL (G.). — Un sencillo metodo de coloracion del reticulo protoplasmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados e invertebrados (Trabajos del Laboratorio de investigaciones biologicas, Univ. Madrid, II, 1903, pp. 129-221).

(3) Monatschrift für Psych. und Neurol., t. XLII, 1917.

(4) Trabajos lab. investig. biol., Madrid, 1922. *Bulletin et Mémoire de la Société Française d'Ophthalmologie*, t. XXXVIII, 1925.

colloïdal, puis 2 à 3 gouttes de solution d'hydroquinone à 1 %. La réduction s'opère à la température ordinaire; le virage s'effectue au chlorure d'or, et la fixation à l'hyposulfite de soude à 5 %.

Méthode de DIETERLÉ (5)

Dans cette méthode, les préparations sont fixées préalablement au formol, et imprégnées de 1 à 6 heures à l'obscurité, à la température de 55° C. avec une solution de nitrate d'argent à 1 %. La réduction s'effectue avec un bain d'hydroquinone.

Méthode de WARTHIN-STARRRY (6)

Comme celle de DIETERLÉ, cette méthode a pour but la recherche des spirochètes dans les coupes, par imprégnation. Après la fixation au formol à 10 %, puis l'action de l'acide nitrique 1 %, permettant de mieux localiser la réduction de l'argent sur les spirochètes, on procède au lavage à l'eau distillée, puis à imprégnation par une solution de nitrate d'argent à 2 % à l'obscurité, de 30 minutes à 2 heures, à la température de 50 à 55° C., la réduction est faite avec le mélange suivant (7) :

Nitrate d'argent à 2 % : 1 partie;

Mélange amidon, gélatine-acétone-quinol 5 parties.

Après lavage la préparation est fixée dans une solution d'hyposulfite de soude à 5 %.

Méthode de VAN ERMENGENH

Ce procédé est un véritable procédé photographique et, de ce fait, il est assez délicat; néanmoins, il est très simple si on opère avec soin sur des lames parfaitement propres et si on emploie exclusivement de l'eau distillée. La moindre trace de doigt, les moindres poussières ou des lavages à l'eau ordinaire déterminent des taches et des précipités.

(5) *Arch. of Neurology and Psychiatry*, n° 18, 1927, p. 73.

(6) *American journal of syphilis*, XIII, 1929, p. 454 et suivantes.

(7) M. LANGERON. — *Précis de Microscopie*, édition 1934, p. 577.

Mode opératoire. — On émulsionne la culture dans l'eau distillée, puis on étale sur une lame porte-objet rigoureusement propre. On fixe (1/2 heure à froid ou 10 minutes à 50°-60° C.) dans le bain suivant :

Acide acétique cristallisable.	IV gouttes
Solution aqueuse d'acide osmique à 2 %	1 gr.
— tanin à 20 %	2 gr.

On lave à l'eau distillée, puis on plonge la préparation pendant 1 à 2 minutes dans une solution de nitrate d'argent dont la concentration varie de 0,5 à 2 %. Lorsque la préparation a pris une teinte grisâtre on la retire et, **sans laver**, on l'immerge immédiatement dans un bain réducteur ainsi composé :

Acide gallique.	0,50
Tanin à l'éther.	0,80
Acétate de soude fondu.	1
Eau distillée.	35

La préparation séjourne 1 à 2 minutes dans le bain réducteur, puis on la lave à l'eau distillée. Certains auteurs utilisent une surcoloration à l'aide du Ziehl ou du rouge neutre pour mettre en évidence les éléments non imprégnés par l'argent.

Méthode aux complexes ammoniaco-argentiques

Il existe en outre toute une série de méthodes d'imprégnation aux complexes ammoniaco-argentiques. Ces procédés, dérivés de la méthode de BIELSCHOWSKY (8), consistent à traiter les préparations par un liquide ainsi préparé : on précipite par la soude, l'argent d'une solution de nitrate d'Ag, sous forme d'oxyde qui est redissout par l'ammoniaque. Les préparations sont alors soumises à l'action réductrice du formol, puis virées au chlorure d'or.

Méthode de FONTANA (9)

Dans la méthode de FONTANA, l'oxyde d'argent est précipité et redissout par l'ammoniaque.

Cette méthode a été utilisée pour la recherche du Tréponème. Après mordantage par le tanin phéniqué et lavage, les préparations sont impré-

(8) *Journal für Psych. und Neurol.* III, 1904, p. 169 et XII, 1909, p. 135.

(9) *Dermat., Woch.*, LV, 1912, p. 1003, et LVI, 1913, p. 301.

gnées par la solution ammoniaco-argentique de FONTANA. On opère à chaud.

Méthodes au carbonate d'argent-ammoniacal

Ce complexe diffère des précédents en ce que l'argent est précipité en carbonate et non pas en oxyde puis redissout dans l'ammoniaque. L'imprégnation se fait à chaud (vers 45-50° C.). L'agent de réduction est le formol. Le virage s'effectue au chlorure d'or et le fixage à l'hyposulfite de soude.

Méthode de KLEIN

Enfin, je ne voudrais pas terminer l'énumération des méthodes d'imprégnation argentique sans citer celle que préconise KLEIN pour colorer la membrane du *Chilodon uncinatus* Ehrbg.

La préparation sur lame porte-objet séchée à l'air est laissée en contact de 6 à 8 minutes avec une solution à 2 % de nitrate d'argent dans de l'eau distillée, puis bien lavée et recouverte d'eau distillée dans une capsule en porcelaine, ensuite exposée à la lumière du jour tamisée. Après 4 à 10 heures suivant l'intensité lumineuse, la réduction se produit.

Contrôler de temps en temps avec le microscope, de façon à interrompre le noircissement dès qu'il est arrivé au degré voulu.

La préparation est alors bien lavée, puis séchée et montée au baume du Canada.

Considérations générales

sur les différentes méthodes d'imprégnation argentique

La plupart de ces méthodes d'imprégnation argentique étaient plutôt destinées à des préparations histologiques qu'à des préparations microbiennes. Si le principe est le même, les différents modes d'imprégnation tiennent compte de facteurs secondaires, tels que lumière ou obscurité, température de la solution de nitrate d'argent, concentration de celle-ci, addition de certains produits au bain argentique, réducteur employé et parfois surcolorant utilisé pour la mise en valeur des éléments non imprégnés, ou des éléments imprégnés, mais non réducteurs. Ces variantes de l'imprégnation et de la réduction devaient retenir mon attention, me guidant sur le choix d'un procédé ou d'un adjuvant pour cher-

cher dans quelles circonstances la réaction de NYFELDT serait le plus sûrement réalisée, même sans un entraînement préalable.

Dans toutes ces méthodes d'imprégnation argentique la réduction de l'argent est-elle bien due à l'action réductrice des éléments imprégnés? En première approximation, toutes ces méthodes sont basées sur un phénomène de réduction, mais cette réduction ne pourrait-elle pas se ramener à une certaine perméabilité de la membrane? En effet, avant imprégnation, Ramon G. CAJAL fixe les préparations dans une solution formolée de nitrate d'uranium, tandis que DA FANQ, utilise une solution formolée de nitrate de cobalt; JALMEL donne sa préférence à une solution de nitrate d'uranium et à l'alcool. Dans le même but SAND, emploie un mélange d'acétone et d'acide azotique; BALBUENA utilise l'alcool pyridine. DIETERLE fait d'abord appel au formol, puis à une solution de nitrate d'uranium; WARTHIN-SARRY, fait agir le formol puis traite à l'acide nitrique; VAN ERMENGHEN, emploie une solution acétique de tanin et d'acide osmique.

Il est probable que lorsque des éléments microbiens sont soumis à l'action successive d'un réducteur ou d'un oxydant d'une part, d'une solution de nitrate d'argent d'autre part, le sel d'argent peut être réduit là où il pénètre, c'est-à-dire dans les cellules déjà imprégnées du réducteur. Où il y a réducteur, se produit évidemment une réduction et d'autre part cette réduction est empêchée où est déjà parvenu un oxydant. Ces imprégnations se ramèneraient donc plutôt à une relativité de la perméabilité des membranes qu'à une différence de pouvoir réducteur des éléments naturels de ces cellules.

En serait-il de même pour la méthode de NYFELDT? Deux hypothèses sont possibles: 1° les Bactéries mortes sont seules perméables à la solution de nitrate d'argent et, naturellement, toutes les Bactéries pourraient renfermer une substance réductrice; 2° les Bactéries mortes seules contiennent une substance réductrice et alors la modification de la perméabilité de la membrane n'interviendrait pas. NYFELDT a été amené à faire ces études sur la différenciation des Bactéries mortes ou vivantes, par l'imprégnation argentique, à la suite du noircissement de la peau morte au contact du nitrate d'argent. Ce noircissement est probablement provoqué par la présence dans la peau, de pigments mélaniques qui ont la propriété de réduire les solutions de nitrate d'argent. Le noircissement serait donc fonction de la perméabilité de membrane des cellules de la peau, les cellules mortes étant perméables plus que les cellules vivantes. Ces propriétés

réductrices de l'argent ou réaction « argent-affiné » (10) ne sont pas seulement provoquées par des pigments et des propigments mélaniques, mais aussi par des granulations de certaines cellules. On suppose que ces propriétés réductrices sont dues à des polyphénols.

D'autre part UNNA (11) a montré que la couche cornée de la peau, par exemple, pauvre en oxygène, cède facilement son hydrogène aux corps avec lesquels elle est en contact; elle appartient donc à la catégorie des tissus réducteurs.

On a proposé beaucoup d'interprétations du phénomène de coloration (12), aucune n'est générale. Les partisans de la théorie chimique pensent que la combinaison du colorant et du corps coloré produit un véritable sel. La molécule albuminoïde est considérée comme renfermant des fonctions acides et basiques, auxquelles la précipitation n'enlève rien de leurs propriétés chimiques générales et qui se combinent avec les fonctions acides et basiques des matières colorantes. UNNA et GOLODETZ (13) ont insisté sur le rôle considérable que joue l'oxygène dans les phénomènes de teinture et sur la nécessité de bloquer les propriétés réductrices des tissus, par l'emploi de fixateurs et de mordants oxydants. En effet, la plupart des fixateurs, réalisés d'abord empiriquement, sont précisément des oxydants acides qui conservent l'oxygène des tissus et diminuent leur pouvoir réducteur.

Les partisans de la théorie physique ne veulent voir dans les colorations qu'une fixation mécanique des matières colorantes par suite de phénomènes d'adsorption (14), sorte de condensation ou d'attraction de nature purement physique, comparable à l'action exercée par le noir animal sur les gaz et sur certaines matières colorantes.

Ces généralités étant établies, j'ai essayé par mes recherches :

1° De reproduire la réaction de NYFELDT.

2° De la confirmer, ou de l'infirmer par de nombreux essais, en faisant varier les germes étudiés et le procédé utilisé pour les tuer, recherchant ainsi si cette réaction peut s'appliquer d'une manière générale.

(10) R. CORDIER. — *Bulletin Histologie appliquée*, IV, 1927, pp. 161-169.

(11) UNNA. — *Die Reduktionsorte und Sauerstoffsorte des tierischen Gewebes*.

(12) Festschrift WALDEYER. — *Arkiv. f. anat.*, LXXVIII, 1911. — M. LANGERON. — *Précis de Microscopie*, p. 443.

(13) UNNA et GOLODETZ. — *Die Bedeutung des Sauerstoffes in der Färberei. Dermatologische Studien*, XXII, 1912.

(14) FRANKENHEIM. — *Lehre von Cohäsion*, Breslau, 1835.

CHAPITRE II

Reproduction des expériences de Nyfeldt

Avant toute chose il me fallait reproduire exactement l'expérience de NYFELDT. Pour cela, j'ai utilisé un *Bacterium Coli*, cultivé sur gélose inclinée de pH = 7,2 et émulsionné avec de l'eau physiologique. J'ai fait un étalement sur lame de cette émulsion. D'autre part, une autre partie de l'émulsion fut soumise à une température suffisante pour tuer les Bactéries, ce dont je me suis assuré en ensemençant un tube de gélose qui, après 24 heures à l'étuve à 37° C. ne montrait aucune colonie. Avec cette émulsion de Bactéries mortes j'ai fait un nouvel étalement. Chacune de ces deux lames, d'abord lavées à l'eau distillée pendant 10', sont ensuite placées à l'obscurité, dans une boîte à rainures, en porcelaine, contenant une solution de nitrate d'argent à 5 %. Cette boîte fut mise ensuite à l'étuve pendant 24 heures, à une température de 37° C., à l'obscurité. Après ce séjour à l'étuve, j'ai retiré ces deux lames en chambre noire, je les ai rincées à l'eau distillée, puis soumises au révélateur (au métol-hydroquinone) dont NYFELDT donne la formule (1); après un nouveau rinçage, je les ai surcolorées au rouge neutre. A l'examen microscopique j'ai obtenu sur la lame contenant l'émulsion de Bactéries vivantes: une grande majorité de germes colorés par le rouge neutre, quelques-uns, environ 1 %, donc **très rares**, noirs, ayant été imprégnés d'argent et enfin quelques amas d'argent réduit. L'autre lame contenant les Bactéries tuées par la chaleur montrait les germes d'une teinte nettement plus foncée que sur l'autre lame, mais sans être noirs; il y avait aussi quelques amas d'argent réduit.

Devant un résultat aussi peu concluant, j'ai pensé qu'une différence de séjour dans l'un des bains successifs de mes deux lames pouvait s'être

(1) Voir p. 4.

produite malgré mon attention. J'ai alors supprimé cette cause d'erreur en faisant l'étalement des Bactéries vivantes et des Bactéries mortes sur la même lame. Les résultats obtenus furent supérieurs aux précédents, bien que les Bactéries mortes avant la fixation ne soient pas parfaitement noires et que sur les deux étalements il y ait encore quelques dépôts d'argent réduit. Plusieurs expériences faites ensuite ne donnaient toujours que des résultats moyens.

Je fis une nouvelle expérience avec une souche différente de *Bact. Coli* X et j'obtins une réduction nette des Bactéries mortes, meilleur résultat que précédemment, bien que j'aie opéré exactement de la même façon. Faisant cette nouvelle série d'essais, j'ai fait une émulsion de la culture du premier *Bact. Coli* employé : culture vieille alors de plusieurs mois ; cette culture ne montrait au microscope aucun germe ayant gardé sa morphologie, donc je n'ai émulsionné que des débris de Bactéries. J'ai fait une série de lames sur lesquelles j'avais disposé une goutte d'émulsion de vieille et de récente cultures, soumise à aucun agent, ni chimique, ni physique. Après développement, l'examen macroscopique de la lame montrait une nette réduction de l'étalement de la vieille culture, réduction confirmée par l'examen microscopique, alors que la culture récente ne contenait que les quelques très rares germes « Ag-positifs » que j'étais habitué de rencontrer dans ces circonstances. J'en vins à penser que si la réduction s'opérait aussi nettement avec les débris microbiens, mes résultats partiels précédents étaient peut-être causés par l'insuffisante pénétration des germes employés par la solution NO^3Ag . Je me proposai donc de faire de nouvelles et nombreuses recherches en faisant varier :

- 1° Les germes étudiés ;
- 2° Les procédés de stérilisation ;
- 3° Les procédés de fixation ;
- 4° Le liquide servant à émulsionner ;
- 5° La température d'imprégnation ;
- 6° La durée des différentes opérations.

I. — CHOIX DU MATÉRIEL BACTÉRIEN

Successivement, comme j'aurai occasion de l'exposer dans les pages suivantes, j'ai renouvelé les expériences précédentes avec de nombreux germes :

Bact. Coli X ;
Bact. Coli phénylogène ;
Bact. Coli (urines) ;
Bact. Coli (selles) ;
Bact. Coli (conserves) ;
Bact. Coli G (eaux) ;
Bact. Coli H ;
Bact. Coli G ;
Bact. Coli Loire II ;
Bact. Coli F ;
Bact. Coli mutabilis ;
Bacille pyocyanique M S ;
Bacille pyocyanique E A ;
Bacille du rouget du porc ;
Staphylocoque doré ;
Bacille paratyphique B ;
Bacille typhique ;
Proteus vulgaris.

Toutes ces souches provenant de la collection du laboratoire de Monsieur LASSEUR.

Je donne, par la suite, le détail des réactions sur chacun des germes étudiés, mais il y a une constance de résultats que je peux déjà mettre en évidence :

1° L' « Ag négativisme » presque absolu de toutes les cultures vivantes ;

2° L' « Ag positivisme » de presque toutes les émulsions de vieilles cultures.

II. — PROCÉDÉS DE STÉRILISATION UTILISÉS

Agents physiques

Le principal agent physique utilisé est naturellement la chaleur ; j'ai utilisé les différentes températures de 56°, 60°, 70°, 80° et 95° C.

J'émulsionnais avec quelques centimètres cubes d'eau physiologique stérile les germes d'une culture de 24 heures, je répartissais quelques gouttes de cette émulsion dans 5 tubes de verre effilés et fermés à une extrémité.

Ces tubes, plongés dans un bain-marie, ont été soumis à une élévation de température progressive, très lente, jusqu'à obtention de la température désirée et je l'ai maintenue, régulière, pendant 30 minutes.

J'ai ainsi porté chacun de ces tubes, pendant une 1/2 heure, l'un à 56° C., un autre à 60° C., un à 70° C., un à 80° C. et le dernier à 95° C. environ, ne pouvant maintenir 100° qui, amenant l'ébullition de l'émulsion la desséchait rapidement.

Agents chimiques

L'emploi des agents chimiques présente des difficultés; en effet, ajoutant soit du formol liquide du commerce, de l'éther ou du chloroforme à l'émulsion microbienne, il fallait compter plusieurs heures avant que la mort ne se produise et pendant ce temps l'autolyse se produisait. J'ai donc préféré agir avec des produits gazeux même s'ils ne déterminent pas toujours la mort des Bactéries (du moins dans mes conditions d'expérience), mais ces agents altéreraient néanmoins les germes et j'avais donc intérêt à observer leur action sur eux. C'est ainsi qu'avec l'eau oxygénée et surtout avec l'oxygène gazeux, je n'ai pas toujours obtenu une stérilisation complète, mais j'avais intérêt à voir comment se comporteraient les Bactéries imprégnées par un oxydant en opposition à celles qui furent tuées par un réducteur: le formol par exemple.

1° Action de l'eau oxygénée

A une émulsion assez riche du germe à étudier placée dans un tube à essais stérile, j'ajoutais un volume à peu près égal d'eau oxygénée; de temps en temps je donnais quelques secousses pour brasser le mélange. Après 30 minutes de contact je portais une goutte de ce mélange sur une lame et la laissais s'évaporer avant de fixer à la flamme.

2° Action de l'oxygène

La dilution dans l'eau oxygénée offrant quelques inconvénients, j'ai essayé l'action de l'oxygène gazeux. Dans un tube à essais stérile, j'ai mis quelques gouttes d'émulsion et, par un tube de verre étiré j'ai fait barboter un courant d'oxygène, lentement, durant 15 minutes. Pendant

que je procédais aux autres modes de stérilisation, avant étalement de l'émulsion différemment traitée, je laissais ce tube, plein d'oxygène, bouché et l'agitais de temps en temps.

3° *Action du formol*

Pour éviter les inconvénients d'une émanation trop abondante de vapeurs de formol, j'ai opéré ainsi : une goutte d'émulsion microbienne est déposée sur une lame porte-objet en évitant d'étaler cette goutte, puis la lame est retournée avec précaution de façon que la goutte reste suspendue au-dessous de la lame, puis celle-ci fut posée sur un flacon à large ouverture, ouvert, contenant un tiers environ de solution de formol. Je chauffais modérément ce flacon en soulevant de temps en temps la lame pour permettre à l'air de s'échapper au fur et à mesure du dégagement des vapeurs de formol. J'entretins la température pendant 10 à 15 minutes à partir du moment où je pus percevoir le dégagement de formol gazeux et laissai la lame retournée pendant 12 heures sans chauffer. Après cela je n'avais plus qu'à retourner la lame avec précaution et laisser évaporer avant de fixer à la flamme.

4° *Action de l'iode*

J'ai opéré de la même façon que précédemment, en goutte pendant au-dessus d'un flacon où j'avais mis au préalable quelques paillettes d'iode que j'ai fait volatiliser par chauffage. Après 10 minutes je retournais la lame, desséchais et fixais à la chaleur, ce qui faisait disparaître les quelques poussières d'iode sublimé sur la lame.

5° *Autre méthode d'action de l'iode*

J'avais mis à part un à deux centimètres cube d'émulsion microbienne dans un tube à hémolyse et j'y ajoutais 2 à 3 gouttes de solution alcoolique d'iode ; après quelques minutes de contact j'ajoutais, goutte à goutte, une solution très diluée d'hyposulfite de soude jusqu'à décoloration. Une goutte déposée sur une lame, séchée et fixée à la chaleur était lavée ensuite à l'eau distillée.

6° *Action de l'éther*

Une goutte d'émulsion microbienne était déposée sur une lame, puis retournée avec précaution au-dessus d'un flacon contenant de l'éther; je l'ai laissée beaucoup plus longtemps en contact : 12 heures environ jusqu'à dessiccation de la goutte d'émulsion.

J'ai fait aussi cette même expérience en portant à l'étuve à 37° C. la goutte d'émulsion déposée sur une lame, puis retournée au-dessus d'un flacon contenant une assez grande quantité d'éther, car, avec l'évaporation, celui-ci disparaissait rapidement; après une heure à l'étuve je retirais et laissais sécher la goutte d'émulsion à l'air libre.

7° *Action de l'acide osmique*

J'ai procédé à peu près de la même façon que précédemment mais en retournant la goutte d'émulsion sur un flacon à petite ouverture de façon que celle-ci soit entièrement fermée par la lame de verre et qu'il soit impossible aux vapeurs d'acide osmique de s'échapper du flacon. J'employais une solution à 2 %. Durée de contact : six à douze heures. Ensuite je laissais évaporer la goutte d'émulsion à l'air libre puis je fixais à la chaleur.

III. — LES PROCÉDÉS DE FIXATION

Pour chaque cas particulier étudié, j'ai utilisé plusieurs modes de fixation.

1° Soit en laissant s'effectuer la dessiccation :

- a) Puis, passage à la flamme;
- b) Ou à l'alcool éther;
- c) Ou à l'alcool méthylique.

2° Après avoir étalé la goutte d'émulsion :

- a) Je trempais immédiatement la lame dans l'alcool éther;
- b) Ou dans l'alcool méthylique.

Je puis dire, dès maintenant, que ces différents procédés de fixation n'ont aucunement influencé les résultats qui sont absolument identiques

quel que soit le moyen utilisé pour la fixation. Il eut semblé cependant qu'il dût en être autrement si l'on veut bien se reporter aux observations de UNNA et GOLODETZ (2) montrant la modification du pouvoir réducteur des Bactéries suivant le fixateur employé.

IV. — CHOIX DU LIQUIDE

SERVANT A PRÉPARER L'ÉMULSION MICROBIENNE

J'ai utilisé l'eau distillée, l'eau physiologique et parfois aussi le liquide de condensation des tubes de gélose inclinée ayant servi à la culture. Les résultats obtenus sont identiques lorsqu'il s'agit de l'imprégnation argentique, surtout qu'après l'emploi de l'eau physiologique j'ai toujours procédé à un lavage à l'eau distillée éliminant le dépôt soluble. Dans le cas de l'eau physiologique, j'ai cependant constaté à l'examen microscopique des dépôts un peu plus abondants d'argent réduit.

V. — TEMPÉRATURE D'IMPRÉGNATION

J'ai opéré, selon la technique de NYFELDT, à 37° C.; j'ai aussi utilisé de plus basses températures (environ 18° C.) mais les résultats sont beaucoup moins bons qu'à 37° C.

VI. — DURÉE DES DIFFÉRENTES OPÉRATIONS

J'ai essayé de modifier la durée de différentes opérations telles que l'imprégnation argentique, le lavage, le développement dans le bain révélateur, le lavage après l'action de ce bain. L'augmentation de durée de l'imprégnation argentique ne m'a donné qu'une quantité un peu plus forte des dépôts d'argent réduit sur la lame; quant à une diminution elle ne pouvait avoir aucun avantage puisque je reprochais à mes premiers essais le manque d'imprégnation.

La durée des lavages, tant avant qu'après l'imprégnation argentique, a une très grande importance car, suivant que le lavage préa-

(2) UNNA et GOLODETZ. — Die Bedeutung des Sauerstoffes in der Färberei. *Dermatologische Studien*, XXII, 1912.

lable avait été plus ou moins long, l'imprégnation se trouvait plus ou moins complète et régulière. Je trouve que le temps de lavage de 10 minutes que préconise Nyfeldt est nécessaire mais suffisant et qu'il faut en tenir compte.

La durée de développement la plus propice est de 4 minutes dans un bain de concentration généralement employée en photographie (3).

VII. — INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

Devant l'inconstance des résultats obtenus j'ai voulu faire quelques essais supplémentaires en partant d'une même souche mais repiquée sur des milieux nutritifs différents. J'ai pu constater que, par exemple, un germe cultivé sur gélose bouillon semble réduire mieux, dans les mêmes conditions d'expérience, que le même germe cultivé sur gélose nutritive.

Ayant procédé à tous ces essais et muni de la meilleure technique je pus entreprendre l'étude successive de la méthode de NYFELDT sur plusieurs germes différents. Naturellement, et je m'en excuse, j'ai dû opérer de préférence avec des germes non pathogènes; la pratique de la pharmacie en même temps que mes recherches m'interdisait, malgré les précautions prises, d'utiliser des germes pathogènes. Cependant, un jour, ayant eu à pratiquer dans ma clientèle un séro-diagnostic de fièvre continue, et ayant opéré, suivant ma méthode favorite, avec des cultures vivantes de Bacilles typhique et paratyphiques A et B, je n'ai pu résister au désir d'essayer sur ceux-ci la méthode de NYFELDT.

Je développerai dans les pages suivantes sous le nom de chaque germe, les essais et les résultats obtenus.

Les étalements ont tous été faits sur des lames porte-objets rigoureusement propres, nettoyés au mélange sulfochromique et flambées 3 fois.

(3) Métol.	2 g.
Hydroquinone.	5 g.
Sulfite de soude.	85 g.
Carbonate de soude.	40 g.
Bromure de sodium.	2 g.
Eau distillée.	1.000 g.

Résultats détaillés de mes expériences personnelles

Essais avec *Bacterium Coli X*

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— — —
— — —	80° C.	— — —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— — —
— — le brôme		— — —
— — l'éther		— — —
— — l'acide osmique		— — —
— — l'oxygène		— — —
— — l'eau oxygénée		— — —
— provenant d'une vieille culture		60 % sont « Ag positives »
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— — —
— — —	80° C.	— — —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— — —
— — l'éther		— — —
— — le brôme		— — —
— — l'acide osmique		— — —
— — l'oxygène		— — —
— — l'eau oxygénée		— — —
— provenant d'une vieille culture		60 % sont « Ag positives »
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— — —
— — —	80° C.	— — —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— — —
— — le brôme		— — —
— — l'éther		— — —
— — l'acide osmique		— — —
— — l'oxygène		— — —
— — l'eau oxygénée		— — —
— provenant d'une vieille culture		30 % sont « Ag négatives »
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli Phénylogène*

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — —	le formol	toutes sont « Ag négatives »
— — —	l'iode	30 % sont « Ag positives »
— — —	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
— — —	l'éther	— —
— — —	l'acide osmique	— —
— — —	l'oxygène	25 % sont « Ag positives »
— — —	l'eau oxygénée	30 % sont —
— — —	provenant d'une vieille culture	30 % sont —
— — —	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — —	le formol	toutes sont « Ag négatives »
— — —	l'iode	— —
— — —	le brôme	— —
— — —	l'éther	— —
— — —	l'acide osmique	— —
— — —	l'oxygène	5 % sont « Ag positives »
— — —	l'eau oxygénée	30 % sont —
— — —	provenant de vieilles cultures	90 % sont —
— — —	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — —	le formol	10 % sont —
— — —	l'iode	toutes sont « Ag négatives »
— — —	le brôme	— —
— — —	l'éther	— —
— — —	l'acide osmique	— —
— — —	l'oxygène	— —
— — —	l'eau oxygénée	50 % sont « Ag positives »
— — —	provenant de vieille culture	60 % sont —
— — —	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli* (urines)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	60 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		30 % sont « Ag positives »
— provenant de vieille culture		60 % sont —
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		30 % sont « Ag positives »
— provenant de vieille culture		60 % sont —
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	60 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		30 % sont « Ag positives »
— — le brôme		toutes sont « Ag négatives »
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		30 % sont « Ag positives »
— provenant de vieille culture		30 % sont —
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli* (selles)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	25 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	15 % sont « Ag positives »
—	le formol	toutes sont « Ag négatives »
—	l'iode	20 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	60 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	60 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli* (conserves)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — — — —	70° C.	— — — — —
— — — — —	80° C.	— — — — —
— — — — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — — — — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — — — — l'iode		20 % sont « Ag positives »
— — — — — le brôme		toutes sont « Ag négatives »
— — — — — l'éther		— — — — —
— — — — — l'acide osmique		— — — — —
— — — — — l'oxygène		— — — — —
— — — — — l'eau oxygénée		— — — — —
— — — — — provenant de vieille culture		30 % sont « Ag positives »
— — — — — vivantes		toutes sont « Ag négatives »

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — — — —	70° C.	— — — — —
— — — — —	80° C.	— — — — —
— — — — —	100° C.	— — — — —
— — — — — le formol		— — — — —
— — — — — l'iode		10 % sont « Ag positives »
— — — — — le brôme		toutes sont « Ag négatives »
— — — — — l'éther		— — — — —
— — — — — l'acide osmique		— — — — —
— — — — — l'oxygène		— — — — —
— — — — — l'eau oxygénée		— — — — —
— — — — — provenant de vieille culture		15 % sont « Ag positives »
— — — — — vivantes		toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — — — —	70° C.	— — — — —
— — — — —	80° C.	— — — — —
— — — — —	100° C.	25 % sont « Ag positives »
— — — — — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — — — — l'iode		— — — — —
— — — — — le brôme		— — — — —
— — — — — l'éther		— — — — —
— — — — — l'acide osmique		— — — — —
— — — — — l'oxygène		— — — — —
— — — — — l'eau oxygénée		— — — — —
— — — — — provenant de vieille culture		60 % sont « Ag positives »
— — — — — vivantes		toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli G* (eaux)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	40 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	50 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	10 % sont « Ag positives »
—	le formol	15 % sont —
—	l'iode	20 % sont —
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	30 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	15 % sont « Ag positives »
—	le formol	10 % sont —
—	l'iode	15 % sont —
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	30 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

Essais avec Bacterium Coli H

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	5 % sont « Ag positives »
—	provenant de vieille culture	toutes sont « Ag négatives »
—	vivantes	—

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	5 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

Essais avec *Bacterium Coli F*

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	5 % sont « Ag positives »
—	le formol	toutes sont « Ag négatives »
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	40 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	15 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	40 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	20 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

Essais avec *Bacterium Coli* (Loire II)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	5 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	60 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	2 % sont « Ag positives »
—	le formol	toutes sont « Ag négatives »
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

Essais avec *Bacterium Coli* (*Mutabilis*)

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	30 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		15 % sont « Ag positives »
— — le brôme		toutes sont « Ag négatives »
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		25 % sont « Ag positives »
— vivantes		5 % sont —

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	50 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		40 % sont « Ag positives »
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	90 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		25 % sont « Ag positives »
— — le brôme		toutes sont « Ag négatives »
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		30 % sont « Ag positives »
— vivantes		2 % sont —

Essais avec Bacille Pyocyanique M. S.

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	— —
— — le formol		— —
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		— —
— vivantes		— —

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	5 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		— —
— vivantes		— —

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	— —
— — le formol		15 % sont « Ag positives »
— — l'iode		toutes sont « Ag négatives »
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		40 % sont « Ag postiiives »
— vivantes		5 % sont —

Essais avec Bacille Pyocyanique E. A.

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	15 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	10 % sont « Ag positives »
—	le formol	toutes sont « Ag négatives »
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	—
—	vivantes	—

Essais avec Bacille du Rouget du Porc

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	15 % sont « Ag positives »
—	le formol	toutes sont « Ag négatives »
—	l'iode	10 % sont « Ag positives »
—	le brôme	toutes sont « Ag négatives »
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	60 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	50 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
—	70° C.	—
—	80° C.	—
—	100° C.	—
—	le formol	—
—	l'iode	—
—	le brôme	—
—	l'éther	—
—	l'acide osmique	—
—	l'oxygène	—
—	l'eau oxygénée	—
—	provenant de vieille culture	10 % sont « Ag positives »
—	vivantes	toutes sont « Ag négatives »

Essais avec Staphylocoque doré

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	— —
— — le formol	10 % sont « Ag positives »	
— — l'iode	80 % sont	—
— — le brôme	toutes sont « Ag négatives »	
— — l'éther	—	—
— — l'acide osmique	—	—
— — l'oxygène	—	—
— — l'eau oxygénée	—	—
— provenant de vieille culture	15 % sont « Ag positives »	
— vivantes	toutes sont « Ag négatives »	

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	20 % sont « Ag positives »
— — le formol	15 % sont	—
— — l'iode	80 % sont	—
— — le brôme	toutes sont « Ag négatives »	
— — l'éther	—	—
— — l'acide osmique	—	—
— — l'oxygène	—	—
— — l'eau oxygénée	—	—
— provenant de vieille culture	60 % sont « Ag positives »	
— vivantes	toutes sont « Ag négatives »	

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	10 % sont « Ag positives »
— — le formol	toutes sont « Ag négatives »	
— — l'iode	80 % sont « Ag positives »	
— — le brôme	toutes sont « Ag négatives »	
— — l'éther	—	—
— — l'acide osmique	—	—
— — l'oxygène	—	—
— — l'eau oxygénée	—	—
— provenant de vieille culture	10 % sont « Ag positives »	
— vivantes	2 % sont	—

Essais avec Bacille typhique

Le pouvoir pathogène de ce germe m'a empêché de faire tous les essais que j'aurais voulu faire. Je n'ai fait toutes les expériences qu'avec la culture sur gélose, émulsionnée à l'eau distillée. Quant à l'émulsion dans l'eau physiologique, je n'ai fait que quelques essais (chaleur à 100° et action de l'iode).

CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à 100° C.	5 % sont « Ag positives »
— — — l'iode	toutes sont « Ag négatives »
— — — provenant d'une vieille culture	— — — — —
— — — vivantes	— — — — —

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à 56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — — 70° C.	— — — — —
— — — 80° C.	— — — — —
— — — 100° C.	5 % sont « Ag positives »
— — — le formol	toutes sont « Ag négatives »
— — — l'iode	— — — — —
— — — le brome	— — — — —
— — — l'éther	— — — — —
— — — l'acide osmique	— — — — —
— — — l'eau oxygénée	— — — — —
— — — provenant de vieille culture	— — — — —
— — — vivantes	— — — — —

Essais avec Bacille paratyphique B.

J'ai fait aussi des essais restreints, les mêmes qu'avec le Bacille d'Eberth.

CULTURE SUR GELOSE

a) *Emulsion avec l'eau physiologique*

Bactéries tuées par la chaleur à 100° C.	toutes sont « Ag négatives »
— l'iode	—
— provenant de vieille culture	—
— vivantes	—

b) *Emulsion avec l'eau distillée*

Bactéries tuées par la chaleur à 56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— 70° C.	—
— 80° C.	—
— 100° C.	—
— le formol	—
— l'iode	2 % sont « Ag positives »
— le brôme	toutes sont « Ag négatives »
— l'éther	—
— l'acide osmique	—
— l'oxygène	—
— l'eau oxygénée	—
— provenant de vieille culture	—
— vivantes	—

Essais avec Bacille Proteus

I. — CULTURE SUR GELOSE

a) Emulsion avec l'eau physiologique

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	10 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		— —
— vivantes		— —

b) Emulsion avec l'eau distillée

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	10 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		15 % sont « Ag positives »
— vivantes		toutes sont « Ag négatives »

II. — CULTURE SUR GELOSE BOUILLON

Bactéries tuées par la chaleur à	56° C.	toutes sont « Ag négatives »
— — —	70° C.	— —
— — —	80° C.	— —
— — —	100° C.	15 % sont « Ag positives »
— — le formol		toutes sont « Ag négatives »
— — l'iode		— —
— — le brôme		— —
— — l'éther		— —
— — l'acide osmique		— —
— — l'oxygène		— —
— — l'eau oxygénée		— —
— provenant de vieille culture		— —
— vivantes		— —

J'ai résumé tous ces résultats en 3 tableaux: l'un avec les germes cultivés sur gélose et émulsionnés dans l'eau physiologique; le deuxième avec les germes cultivés aussi sur gélose, mais émulsionnés à l'eau distillée; enfin le troisième avec les germes cultivés sur gélose bouillon et émulsionnés à l'eau physiologique.

Cette disposition en tableau facilite la comparaison.

Pour simplifier et donner une vision plus claire des résultats comparés, je me suis servi de 3 signes (+) ou (—) et j'ai exprimé proportionnellement à l'« Ag positivisme » avec des signes + —. C'est ainsi que:

(+ — —) signifie « Ag positif » jusqu'à 30 %

(+ + —) — — — — — de 30 à 60 %

(+ + +) — — — — — de 60 à 100 %

Cette notation n'est pas précise, mais facilite les comparaisons des différents résultats obtenus.

Germes étudiés Culture sur gélose Emulsion dans l'eau physiologique	Vivants	Soumis			
		Chaleur			
		56°	70°	80°	100°
Bact. Coli X.	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —
Bact. Coli phénylogène. ...	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —
Bact. Coli (urines).....	— — —	— — —	— — —	— — —	+ +
Bact. Coli (selles).	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
Bact. Coli (conserves).	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —
Bact. Coli G (eaux).....	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
Bact. Coli H.	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
Bact. Coli F.	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —
Bact. Coli Loire II.....	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
Bact. Coli mutabilis.	+ — —	— — —	— — —	— — —	+ +
B. pyocyannique M S.....	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
B. pyocyannique E A.....	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
Bacille du rouget du porc.	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —
Staphylocoque doré.	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
B. Eberth.	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
B. paratyphique B.	— — —	— — —	— — —	— — —	— —
B. proteus.	— — —	— — —	— — —	— — —	+ —

Germes étudiés Culture sur gélose Emulsion dans l'eau distillée	Vivants	Sous			
		Chaleur			
		56°	70°	80°	100°
Bact. Coli X.	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli phénylogène....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli (urines).	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli (selles).	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli (conserves).	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli G ⁻ (eaux).....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli H.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli F.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli Loire II.....	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli mutabilis.	— — —	— — —	— — —	— — —	+
B. pyocyanique M S.....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
B. pyocyanique E A.....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bacille du rouget du porc.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Staphylocoque doré.	— — —	— — —	— — —	— — —	+
B. typhique.	— — —	— — —	— — —	— — —	+
B. paratyphique B.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
B. proteus.....	— — —	— — —	— — —	— — —	+

ACTION DE

Vapeurs de					H ² O ²	vieille culture
formol	iode	brôme	éther	acide osmique		
---	---	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	+ - -	+ + +
---	---	---	---	---	---	+ + -
---	+ - -	---	---	---	---	+ + -
---	+ - -	---	---	---	---	+ - -
+ - -	+ - -	---	---	---	---	+ - -
---	---	---	---	---	+ - -	---
---	+ + -	---	---	---	---	+ - -
---	---	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	+ + -
+ - -	+ + +	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	---	---
---	+ - -	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	+ - -

Germes étudiés Culture sur gélose-bouillon Emulsion dans l'eau physiologique	Vivants	Soumission			
		Chaleur			
		56°	70°	80°	100°
Bact. Coli X.	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli phénylogène. ...	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli (urines).....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli (selles).	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli (conserves).	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli G (eaux).....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli H.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli F.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bact. Coli Loire II.....	— — —	— — —	— — —	— — —	+
Bact. Coli mutabilis.	+ — —	— — —	— — —	— — —	+
B. pyocyanique M S.....	+ — —	— — —	— — —	— — —	—
B. pyocyanique E A.....	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Bacille du rouget du porc.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
Staphylocoque doré.	+ — —	— — —	— — —	— — —	+
B. Eberth.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
B. paratyphique B.	— — —	— — —	— — —	— — —	—
B. proteus.	— — —	— — —	— — —	— — —	+

L'ACTION DE

Vapeurs de					H ² O ²	vieille culture
formol	iode	brôme	éther	acide osmique		
---	---	---	---	---	---	+ - -
+ - -	---	---	---	---	+ + -	+ + -
---	+ - -	---	---	---	+ - -	+ - -
---	---	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	---	+ + -
+ - -	+ - -	---	---	---	---	+ - -
---	+ - -	---	---	---	---	---
---	+ + -	---	---	---	---	+ - -
---	---	---	---	---	---	---
---	+ - -	---	---	---	---	+ - -
+ - -	---	---	---	---	---	+ + -
---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	+ - -
---	+ + +	---	---	---	---	+ - -
---	---	---	---	---	---	---

COMPARAISON DES RÉSULTATS

La comparaison des résultats ci-dessus ne permet ni confirmation, ni infirmation de la théorie de NYFELDT.

D'une façon générale les Bactéries vivantes sont « Ag négatives », mais l'« Ag positivisme » n'est pas général pour les Bactéries tuées.

Tuée par la chaleur à 56° C., 70° C. et 80° C., aucune Bactérie n'est « Ag positive ». Il en est de même par l'éther et par l'acide osmique.

Le formol n'a rendu « Ag positives » que quelques unes, très rares, des Bactéries qu'il a tuées; il en est de même avec l'oxygène et l'eau oxygénée.

L'iode et la chaleur à 100° C. ont mis en évidence le plus grand nombre de Bactéries « Ag positives », mais sans pour cela donner des résultats assez constants pour permettre d'établir une méthode générale.

Ce sont enfin les émulsions de vieilles cultures qui ont donné le plus de « Ag positivisme ». A ce sujet, si j'ai donné un chiffre approximatif d'« Ag positivisme », ce n'est évidemment pas en comptant les Bactéries ayant réduit l'Ag puisque, du fait de la lyse, il n'y avait plus de corps bactériens intacts. J'ai opéré par comparaison autant macroscopique que microscopique avec les autres résultats, opérant avec des émulsions de même opacité. Ces expériences avec des émulsions de vieilles cultures n'ont évidemment pas une grande précision, mais j'ai trouvé intéressant de faire la comparaison.

Le Dr LANGERON dans son Précis de Microscopie, envisageant les causes d'insuccès lors d'imprégnation argentique de coupes histologiques, conseille d'employer des produits chimiques absolument purs: l'eau distillée doit aussi être très pure et pour cela redistillée au laboratoire, de préférence sur du permanganate de potasse pour écarter toute trace de matière organique susceptible de provoquer la réduction de l'argent. Il faut éviter aussi très soigneusement les poussières, particulièrement celles qui se déposent sur le goulot du flacon contenant la solution de nitrate d'argent.

Tenant compte de ces recommandations, j'ai recommencé quelques imprégnations, avec des germes déjà employés précédemment, afin de pouvoir comparer les résultats. Ceux-ci furent absolument identiques aux précédents obtenus.

CHAPITRE IV

Essais sur plaques photographiques

Devant des résultats aussi peu réguliers, quoique non négatifs cependant, j'ai eu l'idée de contrôler le pouvoir réducteur des Bactéries mortes ou vivantes sur l'argent de plaques photographiques au gélatino bromure d'argent. Je ne veux pas entamer ce chapitre sans adresser l'assurance de toute ma reconnaissance aux Etablissements Lumière de Lyon qui ont mis gracieusement à ma disposition des échantillons de plaques photographiques pour ces essais.

J'avais été inspiré, pour faire ces expériences par une étude de Walter C STEVENSON (1).

« Il paraît que les plaques photographiques au gélatino-bromure d'argent sont sensibles aux produits de certaines Bactéries et que les effets donnés varient avec les microbes, d'où possibilité d'une nouvelle technique pour les distinguer les uns des autres. »

« STEVENSON prépare des cultures en bouillon de *B. typhosus* et de « *Bact. Coli*. Après 24 heures, on répand quelques gouttes de chaque culture sur la surface sensible d'une plaque photographique, de façon à couvrir un espace de 1 ou 2 cm. de diamètre, ce qui nécessite environ 0,20 cm³ du bouillon. Alors, toujours dans une chambre éclairée par la lumière rouge, on recouvre d'une plaque opaque la préparation, que l'on abandonne ainsi pendant 40 minutes. »

« On enlève le couvercle, on retire avec une pipette le bouillon en excès et on développe le cliché comme à l'ordinaire. On voit alors ceci : la réduction du sel d'argent est beaucoup plus prononcée avec le Coliba-

(1) WALTER (C.), STEVENSON. — Differentiation of *B. typhosus* and *B. coli communis* by means of the photographic plate. *Brit. med. Journ.*, 30 avril 1904, p. 1004.

« eille qu'avec le Bacille typhique, lequel n'agit que très légèrement. La
« différence est surtout marquée lorsqu'on compare une culture de Coli-
« bacille de 24 heures avec une culture de Bacille typhique d'environ
« 1 mois. **Mais si l'on prend soin de stériliser les cultures, elles con-**
« **servent leurs propriétés vis-à-vis de la plaque sensible.** »

STEVENSON a constaté, chose curieuse et paraissant contraire à la théorie de NYFELDT, qu'une culture de Bacille typhique de un mois réduit moins l'argent qu'une culture de Colibacille de 24 heures et mieux encore, que ces propriétés vis-à-vis de la plaque sensible restent les mêmes si l'on stérilise les cultures.

Stevenson est donc affirmatif en disant que les Bactéries mortes ne réduisent pas davantage que les Bactéries vivantes.

Mes essais ne me conduisent pas à la même affirmation que STEVENSON.

*
* *

NOUVELLES RECHERCHES

J'ai choisi, comme matériel bactérien, le *Bact. Coli* qui justement avait été expérimenté par STEVENSON et lui avait donné les plus fortes réductions.

J'ai fait une culture de Colibacille sur gélose inclinée. Agée de 24 heures, cette culture a été émulsionnée dans de l'eau distillée; j'ai mis à part une partie de cette émulsion de Bactéries vivantes et j'ai divisé l'autre partie en trois tubes; j'ai fait barboter dans l'une de ces parties un courant prolongé d'oxygène, une deuxième partie a été soumise 10 minutes à la température de 100° C., quant à la troisième, je l'ai stérilisée par action des vapeurs de formol. J'ai choisi ces procédés de stérilisation pour avoir une mort des Bactéries par un réducteur, par un oxydant et par un agent physique, je serais ainsi en de meilleures conditions pour juger en même temps l'influence de la mort et celle de l'agent stérilisateur sur la réduction de l'argent.

J'ai fait sur une plaque photographique, un étalement de l'émulsion de

Colibacilles vivants, sur d'autres une goutte de Colibacilles tués par la chaleur, par le formol ou par l'oxygène.

J'ai laissé en chambre noire pendant une heure, puis développé, à la lumière rouge, avec le révélateur de NYFELDT (2) et enfin fixé à l'hypo-sulfite, je dois avouer que tous ces essais ne m'ont donné aucun résultat pratique. J'ai recommencé avec des émulsions très épaisses et un temps plus ou moins long sans plus de succès. En effet, un contact de une heure ne donnait aucune réduction appréciable et, avec un contact prolongé, l'émulsion s'évaporait et n'agissait pas mieux. D'autre part il était très malaisé de comparer la différence de réduction sur des plaques différentes. C'est alors que j'ai eu l'idée des procédés suivants :

1° *Procédé en vase clos.* — Sur une même plaque photographique j'ai disposé avec précaution pour ne pas les étaler et les laisser aussi épaisses que possible des gouttes d'émulsion vivante, puis tuée par chacun des procédés énumérés ci-dessus (chaleur, formol, oxygène). Cette plaque photographique était préalablement déposée dans une cuve en porcelaine de dimensions appropriées; la goutte d'émulsion étant déposée, j'ai recouvert la cuve d'une grande plaque en verre. J'ai pu ainsi conserver avant dessiccation 12 et même 18 heures. Les résultats obtenus ont été beaucoup plus satisfaisants.

2° *Procédé de la goutte suspendue.* — J'ai disposé comme précédemment une petite goutte d'émulsion vivante ou tuée par chacun des procédés énumérés, sur plaque photographique. Puis aussitôt après j'ai retourné d'un mouvement doux cette plaque, je l'ai posée sur un récipient creux; les gouttes ainsi retournées n'avaient pas tendance à s'étaler comme par le procédé précédent, aussi je suis arrivé à conserver ces gouttes 24 heures sans dessiccation. J'ai eu ainsi les meilleurs résultats que j'indique ci-dessous.

Pour la facilité des comparaisons j'avais disposé une goutte d'émulsion vivante entre chacune des gouttes d'émulsion tuées. J'ai pensé qu'il serait intéressant de pouvoir comparer le pouvoir réducteur d'une culture microbienne très ancienne; j'ai donc émulsionné une culture de Colibacilles

(2) Révélateur de NYFELDT: Métol 2; Sulfite de soude 85; Hydroquinone 5; Carbonate de soude 40; Bromure de sodium 2; Eau distillée 1.000.

vieille de plus, d'un an et j'ai déposé une goutte de cette émulsion à la suite des autres. La disposition était donc la suivante :

1	(2)	3	(4)
5	(6)	7	8

- En (2), (4) et (6) une goutte d'émulsion vivante ;
En 1 une goutte d'émulsion de bactéries tuées par la chaleur ;
En 3 une goutte d'émulsion de bactéries soumises à l'oxygène ;
En 5 une goutte d'émulsion de bactéries tuées par le formol ;
En 7 une goutte d'émulsion de vieille culture, soumise à aucun agent chimique ou physique ;
En 8 une goutte d'émulsion de bactéries tuées par l'alcool-éther.

Les résultats obtenus ont été très intéressants et je dirais même très curieux.

Après un contact des émulsions avec la plaque photographique pendant une vingtaine d'heures, à la chambre noire, j'ai rincé ces plaques à l'eau distillée, puis développé au révélateur de NYFELDT, au métol hydroquinone. Après un rinçage prolongé je les ai traitées dans un bain d'hyposulfite pour la dissolution de l'argent non réduit et j'ai obtenu :

En 2, 4 et 6, où étaient les gouttes d'émulsion de Colibacilles vivants, une tache blanche : donc, aucune réduction et ceci sur toutes mes plaques ; cette partie a même été protégée contre l'action réductrice du bain de métol hydroquinone.

En 1 (tué par la chaleur) une tache grise bordée d'une zone blanche. Réduction sensible mais peu marquée.

En 3 (soumis à l'oxygène) un résultat analogue au précédent. Réduction sensible, mais peu marquée.

En 5 (tué par le formol) la gélatine a été altérée chaque fois à cet endroit par le formol, cependant sur une des plaques j'ai pu constater une faible réduction bordée d'une zone claire dégradée.

En 7 (culture vieille) une tache noire entourée d'un filet blanc, très fin, puis d'un filet noir, puis extérieurement d'une zone claire dégradée. Réduction très nette.

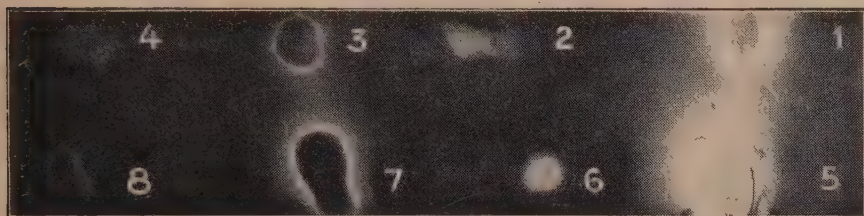
En 8 (tué à l'alcool-éther) une tache grisâtre bordée d'une zone claire dégradée. Réduction faible.

Voir figures.

Ces résultats se sont reproduits identiquement à chaque nouvel essai.

FIGURES

J'ai fait une reproduction, sur papier, des traces de réduction obtenues sur plaque photographique. A remarquer dans ces essais différents (la disposition des gouttes étant la même) qu'en 2, 4 et 6 il n'y a ni réduction, ni auréole; il s'agissait d'une émulsion de Bactéries vivantes. Partout où il y a réduction, la trace de celle-ci est entourée d'une zone où non seulement il n'y a pas de réduction, mais où l'action réductrice du bain a été empêchée; il semblerait s'agir d'un pouvoir oxydant opposé au pouvoir réducteur du centre de la goutte.



J'ai été étonné de constater la différence existant sur 2 préparations, entre les 2 manifestations de la goutte d'émulsion vieille (7): sur les préparations, en général, la réduction est très nette mais sur l'une d'elles la réduction est nulle, alors que j'ai opéré dans les mêmes conditions.

AGRANDISSEMENTS

J'ai été surpris de constater que les traces de réduction étaient entourées d'une ligne de non réduction, puis d'une mince zone de réduction et enfin d'une zone de non réduction dégradée. J'ai cru intéressant de donner un agrandissement de trois de ces traces 1, 3 et 7 très curieuses (fig. 1, fig. 2, fig. 3). Cette zone ne peut pas s'expliquer par une action chimique du produit ayant servi à tuer les Bactéries, car elle se retrouve plus nette encore où l'âge seul a agi. Si une dessiccation des bords de la goutte devait être envisagée pour expliquer ce phénomène, elle ne pour-

rait pas être retenue car les émulsions vivantes renfermaient le même nombre de germes et ne donnent pas du tout cette zone.

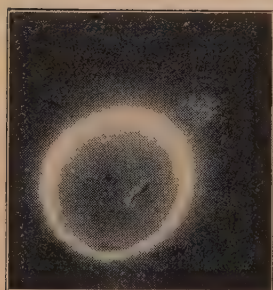


Fig. 1

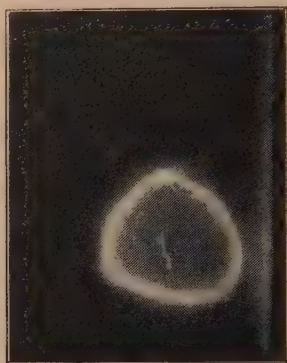


Fig. 2



Fig. 3

D'autres expériences faites avec une émulsion de Staphylocoque ont donné des résultats légèrement différents. J'ai déposé sur une plaque photographique :

N° 1. — Une goutte d'émulsion à l'eau distillée d'un Staphylocoque ayant été cultivé sur gélose nutritive et tué par la chaleur.

N° 2. — Une goutte d'émulsion à l'eau distillée d'un Staphylocoque ayant été cultivé sur gélose bouillon et tué par la chaleur.

N° 3. — Une goutte d'émulsion à l'eau distillée d'une vieille culture de Staphylocoque (1 mois) ayant été cultivé sur gélose nutritive.

N° 4. — Une goutte d'émulsion à l'eau distillée d'un Staphylocoque vivant provenant d'une culture sur gélose nutritive.

Donc, en 1 et en 2 il y avait des germes tués avant fixation, mais provenant d'un milieu de culture différent.

En 3, une vieille culture.

En 4, une émulsion de germes vivants.

Après action de ces émulsions sur la plaque photographique pendant 12 heures, lavage, puis développement au bain réducteur au métol-hydroquinone, fixation à l'hyposulfite et lavage ; l'examen de la plaque montre :

En 1 : très légère réduction au centre de la goutte mais bordée d'une zone plus claire.

En 2: réduction nette bordée aussi d'une mince zone de non réduction.

En 3: très légère réduction.

En 4: aucune réduction.

Donc partout où avait été déposée une goutte d'émulsion d'un germe tué avant fixation il y a réduction; de même, j'ai obtenu une réduction où était déposée l'émulsion d'une vieille culture; enfin il n'y avait aucune réduction où étaient déposées les gouttes d'émulsion de Cocci vivants. Ceci semble confirmer la théorie de NYFELDT adaptée à cette méthode sur une plaque photographique mais la réduction est parfois bien faible et ne pourrait pratiquement pas, dans les conditions d'expérience décrites ci-dessus, servir à différencier les Bactéries vivantes des Bactéries mortes; il faut tout au moins pouvoir comparer **sur la même plaque** l'action réductrice des Bactéries vivantes et des Bactéries mortes.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

SUR LA DIFFÉRENCIATION DES BACTÉRIES VIVANTES ET MORTES

PAR L'ACTION RÉDUCTRICE SUR UNE PLAQUE PHOTOGRAPHIQUE

L'étude des propriétés réductrices des Bactéries sur une plaque photographique donne des résultats beaucoup plus nets que la méthode de NYFELDT; si les résultats sont probants pour les Bactéries vivantes il en est tout autrement pour les Bactéries mortes, en effet, intervient le procédé de stérilisation employé qui influe très fortement sur l'intensité de la réduction. Cependant une chose est certaine, les Bactéries provenant d'une vieille culture, entièrement autolysées, provoquent en général une réduction très nette, ce qui laisserait supposer que la lyse de ces germes libérerait une matière réductrice

Mais, la présence de cette matière réductrice est-elle habituelle dans les Bactéries ou consécutive à la mort? Si l'on pouvait démontrer la présence habituelle d'une manière réductrice dans **toutes** les Bactéries, la réduction de l'argent serait fonction de la perméabilité ou de la dissociation de la membrane; mais, pour que cette méthode soit applicable, il faudrait que le pouvoir réducteur interne de **toutes** les Bactéries soit à peu près semblable, **car il serait impossible de juger l'état de vie ou de mort si chaque Bactérie offrait un coefficient propre de réductibilité**; on ne pourrait appliquer cette méthode que

pour tel germe bien déterminé dont on est accoutumé à apprécier le pouvoir réducteur.

DE REY PAILHADE constatait déjà en 1888 (3) la propriété réductrice des tissus vivants.

Les travaux du Professeur ROGER (4), du Professeur VALLOT (5) s'appliquent surtout aux tissus animaux.

Le principe du pouvoir réducteur des Bactéries a été étudié par plusieurs auteurs. C'est ainsi que M. NICOLLE (6), étudiant les colorations vitales des microbes, a constaté que ceux-ci se défendent contre les couleurs qu'on ajoute en les détruisant plus ou moins complètement et que cette destruction, à l'abri de l'air, est précédée d'une réduction.

A. MAASSEN (7) étudiant les actions chimiques exercées par les microbes disait déjà en 1904. « On a constaté chez les micro-organismes (Bactéries, moisissures, levures) des propriétés réductrices. »

En conclusion : les Bactéries vivantes n'ont pas réduit l'argent et les Bactéries mortes ou tuées l'ont réduit plus ou moins. Cependant deux choses m'ont frappé :

1° La réduction beaucoup plus intense provoquée par l'émulsion d'une très ancienne culture de Colibacilles dont les germes (je l'ai constaté par un examen microscopique) avaient tous subi l'autolyse.

2° La bordure blanche qui entourait la trace des réductions et surtout la double bordure blanche formée autour de la réduction intense due à la vieille culture microbienne. La bordure blanche externe est toujours dégradée comme si elle avait été provoquée par une radiation dont l'intensité diminuerait en s'éloignant de la goutte d'émulsion.

J'ai naturellement eu l'idée de recommencer ces expériences sur d'autres plaques photographiques avec d'autres germes mais l'impossibilité de

(3) DE REY PAILHADE. — As. Sc. Cr., VI, p. 1683, 1888. *C. R. Soc. biol.*, 3 avril 1897. — Sur les ferments oxydants. Note sur l'existence simultanée dans les tissus animaux du philotion et de l'oxydase chargée de les oxyder.

(4) ROGER (H.). — Recherches expérimentales sur le pouvoir réducteur des tissus. *Revue de Médecine*, 38^e année, 1921, n° 1.

(5) VALLOT (J.). — *C. R. A. Sc.*, t. CLXXIII, p. 1196, 1921.

(6) *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. I, 1^{re} année, n° 4, p. 143. « Les colorations vitales des microbes. »

(7) MAASSEN (A.). — Über das Reeduktionsvermögen der Bakterien, und über reduzierende Stoffe in pflanzlichen und tierischen Zellen. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. II, 2^e année, 15-11, 1904.

me servir de Bactéries pathogènes à cause de la proximité toujours possible de préparations pharmaceutiques en cours m'ont empêché de comparer l'action du Bacille typhique à celle du Colibacille, ainsi que l'a fait STEVENSON. Cependant ce sujet est loin d'être épuisé car la plaque photographique s'est montrée fort intéressante pour l'étude des propriétés réductrices des Bactéries.

Toutes les cellules animales et végétales possèdent un pouvoir réducteur comme l'ont montré GAUTHIER et EHRLICH.

Les Bactéries anaérobies même ne font pas exception à la règle générale des être vivants, elles produisent des oxydations, mais à la faveur de réductions préalables. M. le Professeur ROGER (8) a pu dire de l'anaérobiose « qu'elle est le phénomène fondamental et universel qui ne compte pas d'exception; l'aérobiose, c'est-à-dire l'oxydation directe par l'oxygène de l'air, est une fonction sur-ajoutée, une véritable fonction de luxe, mais qui a fini par l'emporter au point de devenir prépondérante et d'être absolument indispensable au maintien de l'existence. »

BEIJERINCK (9) s'est appliqué à démontrer le pouvoir réducteur des Bactéries.

M. le Professeur LASSEUR et ses collaborateurs (10) ont étudié le pouvoir réducteur en fonction du pH de corps microbiens rigoureusement débarrassés de leur milieu nutritif par cinq lavages à l'eau distillée.

(8) H. ROGER. — Recherches expérimentales sur le pouvoir réducteur des tissus. *Revue de Médecine*, 38^e année, 1921, n° 1.

(9) Phénomènes de réduction produits par les microbes. *Arch. des Sciences exactes et naturelles*, Haarlem, série II, t. IX, 1904, pp. 131-157.

(10) D. BACH et Mlle J. LAMBERT. — Sur la préparation des émulsions bactériennes destinées à l'étude des déshydrogénases par la méthode de Thünberg Quastel. *Bull. Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, décembre 1937, n° 15.

D. BACH et Mlle J. LAMBERT. — De l'influence des conditions de culture sur l'activité des déshydrogénases du Staphylocoque doré. *Bull. Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, mai 1938, n° 16.

L. GENEVOIS. — Action des dérivés organiques halogénés sur les cellules vivantes. *Bull. de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, mai 1934, n° 8.

CHAPITRE V

Notions sommaires sur la perméabilité de la membrane

Après ces différentes expériences je fus amené à penser que la différenciation des Bactéries vivantes et mortes par l'imprégnation argentique se ramenait uniquement à une question de différence de perméabilité de membrane.

Le passage d'une particule à travers une membrane dépend de l'état de cette membrane, la perméabilité variant très sensiblement en des endroits différents. Il dépend naturellement du diamètre des pores, de leur longueur; puis alors interviennent les phénomènes d'attraction, de forces de la tension de surface, d'adsorption, de charge électrostatique, etc., qui modifient très nettement la perméabilité. Après de nombreuses mesures, BECHHOLD (1) affirme que la largeur d'un pore doit être au moins de huit à quinze fois plus grande que le diamètre de la particule pour la laisser passer.

Mais la question de perméabilité de la membrane s'est révélée fort complexe et aucun auteur, malgré les très nombreuses recherches effectuées jusqu'à ce jour, n'a pu en donner une explication certaine et d'ordre général. GELLHORN a fait une étude complète et la critique de toutes ces recherches et reprend l'une après l'autre les différentes hypothèses émises. J'ai donc pris de larges extraits, concernant cette question, dans le remarquable ouvrage de GELLHORN traduit et complété par J. RÉGNIER.

(1) BECHHOLD. — Ferment oder Lebewesen, Sonder-Abdruck aus « Kolloid-Zeitschrift », Band 66, Heft 3, 1934, p. 336.

GELLHORN fait remarquer (2) que la **fixation** d'une substance par une cellule ne s'identifie pas du tout avec la **pénétration** de cette substance dans la cellule. C'est en somme la différence entre l'**adsorption** et la **perméabilité**.

« DE VRIES (1871) et PLEFFER (1877) (3) ont montré, dans des expériences classiques, que la cellule végétale, fait remarquable, se comporte « comme une cellule hémiperméable, en ce sens que son protoplasme permet l'entrée de l'eau sans permettre celle des substances dissoutes. »

E. GELLHORN cite (4): « OVERTON (1895-99) avait cru voir en s'appuyant sur des expériences d'osmose effectuées sur des cellules végétales et animales, que les cellules étaient imperméables aux sels. En ce qui concerne spécialement les cellules végétales il avait tiré cette conclusion du fait que les cellules pouvaient être plasmolysées quand on les plaçait dans des solutions de différents sels et que la plasmolyse ne diminuait pas quand on maintenait les cellules dans les solutions plasmolysantes. »

Ceci n'a pas été confirmé par FITTING (5) (1915) ni par OSTERHOUT (6) (1911-13).

RUFZ DE LAVISON (7) avait étudié, dès 1910, le mode de pénétration de quelques sels, dans le protoplasma (8). Il était arrivé aux constatations suivantes: les cations alcalins et alcalino-terreux unis à un anion non toxique pénètrent facilement, les sels de Ba, Cs et les iodures pénètrent difficilement. Certains sels d'Al, d'Yttrium et la grande majorité des sels

(2) « Das Permeabilitätsproblem », par E. GELLHORN. Traduction de Jean Régner, p. 5.

(3) J. RÉGNIER, *id.*, p. 18.

(4) ERNEST GELLHORN, trad. J. Régner, « La Perméabilité en physiologie et en pathologie générale, p. 111.

(5) A. FITTING. — Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle, *J. C. Bot.*, 56 (Pfeffer, Festschr.), I, 1915.

(6) OSTERHOUT W.-J.-V. — The permeability of living cells to salts in pure and balanced solutions. *Science*, N., s. 34, 187, 1911.

(7) RUFZ DE LAVISON. — *Revue générale de Botanique*, 1910, t. XXII, 225 et *Annales des Sciences naturelles*, Botanique, 1911, 90, s., t. XIV, p. 97.

(8) J. RÉGNIER. — Note personnelle sur traduction de la « Perméabilité en physiologie et pathologie générale », par E. GELLHORN, p. 111.

de métaux lourds ne pénètrent pas dans le protoplasme vivant (9). Il avait déjà montré, par ailleurs le fait important que la perméabilité du protoplasme, à de faibles concentrations, est un phénomène absolument différent de la perméabilité sous de fortes concentrations, dans ces dernières conditions, le protoplasme devenant complètement perméable.

Il avait, en outre, présenté d'autres remarques sur l'action toxique des sels, rapprochée de l'action toxique de leurs constituants acides et basiques.

OSTERHOUT appliquant la même méthode qu'OVERTON à l'étude des « cellules de Spirogyre, trouva que, peu après le début de la plasmolyse, « se produisait une déplasmolyse qui devenait maximale après une demi « heure. Mais si l'on maintenait les cellules dans la même solution, pendant un temps encore plus long, il se produisait un ratatinement du « protoplasme, phénomène cette fois irréversible, donc différent dans son « principe de la plasmolyse. OVERTON avait probablement pris cette « phase pour une plasmolyse vraie. »

FITTING, de son côté, en étudiant à l'aide de sa méthode de la « plasmolyse-seuil » la marche exacte de la déplasmolyse, constata que la plasmolyse régresse lentement dans des solutions de sels alcalins. Par séjour prolongé dans la solution, cette déplasmolyse devient de plus en plus faible et finalement s'arrête.

Il ne faut pas en conclure, ce qu'a bien montré HÆBER (1926) (10) que la perméabilité pour les sels diminue de plus en plus : il faut y voir plutôt l'influence de phénomènes secondaires, tels que l'exosmose des substances cellulaires.

« En effet, nous savons qu'après un séjour prolongé en présence « de sels (tels que NaCl) les cellules subissent des lésions qui amènent peu à peu la mort. **Ces phénomènes de lésions se traduisent « par une perméabilité croissante des cellules. L'imperméabilité relative, pour les sels, est donc caractéristique de l'intégrité de la « cellule. Elle ne s'observe jamais pour une cellule lésée ou morte. »**

Les cellules végétales présentent des perméabilités différentes pour les différents ions.

(9) OSTERHOUT. — Some quantitative researches on the permeability of plant cells. *Plant World* 16, 129, 1913.

(10) HÖBER. — *Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe*, 6, Aufl, Leipzig, 1926.

Les observations de FERRING et celles d'OSTERNOUT ne sont pas seulement remarquables parce qu'elles apportent la preuve indiscutable de la perméabilité pour les sels, elles le sont encore parce qu'elles montrent qu'il existe, à ce point de vue, des différences entre les divers sels qui jouent un rôle en biologie.

D'après FERRINGS, si l'on considère leur facilité de passage, les sels s'ordonnent dans l'ordre suivant, en commençant par ceux qui passent le mieux.

K, Na > Li > Mg, Ca, Ba, Sr.

No³, Cl, Br > So⁴.

J. RÉGNIER (11) conclue que la cellule végétale intacte est perméable pour les sels, mais cette perméabilité ne conduit jamais à l'équilibre de diffusion. La perméabilité pour les sels est tout à fait variable pour les différents sels. Elle est déterminée aussi bien par les cations que par les anions. Cette perméabilité est parallèle à l'action favorable qu'exercent les sels sur le gonflement. Elle a son minimum dans une solution équilibrée.

Influences qu'exercent les facteurs extérieurs et intérieurs sur la perméabilité de la cellule végétale

Température. — L'influence de la température sur la perméabilité de la membrane plasmatique est un exemple de l'action des facteurs physiologiques.

Il nous faut admettre (12) que la température agit, de façon très inégale. Il paraît, en effet, résulter d'observations faites sur la vitesse de passage de différentes substances dans la cellule végétale, en tenant compte des concentrations, que la pénétration se fait d'une façon tout à fait différente selon les substances. « C'est ainsi que, d'après BLACKMANN et PAINE (13) (1918), l'exosmose des électrolytes n'augmente « que très faiblement (pour *Mimosa pudica*) avec la température, exactement comme s'il s'agissait d'un processus de diffusion. Il faut at-

(11) J. RÉGNIER, trad. de la « Perméabilité en physiologie et pathologie générale », de E. GELLHORN, p. 132.

(12) J. RÉGNIER, p. 163.

(13) BLACKMANN et PAINE. — Studies in the permeability of the pulvinus of *mimosa pudica*. *Ann of Bot.* 32, 69, 1918.

« teindre 55° C. pour voir le coefficient augmenter; cette augmentation, « liée vraisemblablement à une lésion irréversible de la cellule, se fait « alors d'une façon brusque. Si donc nous tenons compte des grandes « différences qui séparent les coefficients de température, nous devons « admettre que ces différences sont probablement liées au fait que la « perméabilité est provoquée par des processus de nature tout à fait « différente ou placée sous leur dépendance. Quoi qu'il en soit, il faut « renoncer à trouver pour le coefficient de température une valeur uni- « forme caractéristique de la perméabilité. »

Lumière. — LEPESCHKIN (1909) (14) et TROENDLE (1910 et 1918) (15) ont montré qu'il se fait, sous l'influence de la lumière, une augmentation de la perméabilité se traduisant par un accroissement de fixation des sels. On peut mettre en évidence ce phénomène, soit en effectuant des irradiations artificielles d'intensité variable, soit en effectuant des comparaisons sur la fixation des sels par les cellules végétales au cours d'irradiations d'intensité très différente. Cette constatation est d'autant plus remarquable que des variations, même relativement faibles, de l'intensité lumineuse exercent une influence nette sur la perméabilité des sels.

HOAGLAND (1923-1929) (16) a donné des preuves directes de cette augmentation de la perméabilité, pour les sels, produite par la lumière. Il a montré que NO^3 , par exemple, s'accumule bien plus vite et bien plus fortement, dans le suc cellulaire, quand les cellules sont irradiées que lorsqu'elles sont maintenues à l'obscurité.

Pression osmotique. — Une augmentation de la pression osmotique augmente la perméabilité de *Spirogyra* pour les colorants acides

(14) LEPESCHKIN W.-W. — Zur Kenntnis des Mechanismus der photonastischen Variations-bewegungen und der Einwirkung des Beleuchtungswechsels auf die Plasmamembran. *Beih. Bot. Zbl.*, Abt I, 24, 308, 1909.

Et, du même auteur: Über die Permeabilitätsbestimmung der Plasmamembran für gelöste Stoffe. *Ber. deutsch. Bot. Ges.* 27, 129, 1909.

(15) TRÖNDLE A. — Der Einfluss des Lichtes auf des Permeabilität der Plasmembran. *J. B. Bot.* 48, 171, 1910.

Et: Der Einfluss des Lichtes auf die Permeabilität plasmahaut und die Methode der Permeabilitäts-koeffizienten. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zurich* 63, 187, 1918.

(16) HOAGLAND D.-R., HIBBARD P.-L. and DAVIS A.-R. — The influence of light, temperature and other conditions on the ability of *Nitella* cells to concentrate halogens in the cell sap. *Hid.* 10, 121, 1926.

(SCARTH 1926) (17). Ce fait est surtout visible si l'on modifie brusquement la pression osmotique. En effet, si on laisse l'équilibre osmotique se rétablir par plasmolyse, on ne trouve plus trace d'une augmentation de la perméabilité. Si d'autre part, on emploie les différents sels aux doses nécessaires pour obtenir, par hypertonie, une augmentation de la perméabilité cellulaire, on constate que les solutions salines nécessaires présentent de grandes différences de pression osmotique. Ce fait s'explique par l'action spécifique qu'exercent certains ions sur la perméabilité. Ainsi, il faut une pression osmotique bien plus forte pour supprimer l'action imperméabilisante du CaCl_2 que pour déclancher l'augmentation de la perméabilité quand la cellule a été simplement traitée auparavant par NaCl .

Action de différents corps chimiques. — SZÜCS (1913) (18) a constaté que l'eau oxygénée augmente la perméabilité de *Spirogyra*. TROENDLE (1921) (19) pense qu'un atmosphère d'H (privation complète d'O) diminue la perméabilité pour les sels.

Les narcotiques (chloroforme, éther, alcool) modifient la perméabilité des cellules végétales, en général une diminution (20).

(17) SCARTH G.-W. — The influence of external osmotic pressure and of disturbance of the cell surface on the permeability of *spirogyre* Protoplasma Lpz I, 204, 1926.

(18) SZÜCS J. — Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der antagonistischen Ionenwirkungen. Ebenda 52, 85, 1913.

(19) TROENDLE A. — Über den Einfluss von Verwundungen auf die Permeabilität nebst ergänzenden Beobachtungen über die Wirkung des Sauerstoffentzugs. *Beih. Bot. Zbl.*, Abt. 2, 38, 353, 1921

(20) E. GELLHORN, trad. J. RÉGNIER, « La Perméabilité en physiologie et pathologie générale », p. 399.

CHAPITRE VI

Théories de la perméabilité

1° THÉORIE LIPOIDIQUE

OVERTON (1) étudiant les cellules végétales et animales, explique ainsi la théorie lipoidique de la perméabilité :

« Les couches limitantes du protoplasme cellulaire sont imprégnées
« d'une substance grasseuse et, en particulier, d'un mélange lécithine-
« cholestérine. La pénétration plus ou moins rapide des différentes subs-
« tances dans les cellules dépend donc de la solubilité de ces substances
« dans ce mélange lécithine-cholestérine, ou plutôt elle dépend de la va-
« leur du coefficient de partage de la substance entre l'eau et ce mé-
« lange. »

2° THÉORIE COLLOIDO-CHIMIQUE

Hypothèse de HANSTEEN-CRANNER (2)

« Les couches plasmatiques des corps cellulaires (membrane extérieure
« du protoplasma et membranes particulières des vacuoles) représentent
« un système colloïdal dont le dispersant demi-solide et hydrophile est
« constitué de phosphatides insolubles dans l'eau, mais colloïdalement
« gonflables et, dans la phase dispersée, liquide, est constituée par des
« phosphatides complètement solubles dans l'eau. »

A l'intérieur de ce système colloïdal il doit exister des relations étroites entre les deux sortes de phosphatides ; il est même possible que ces deux

(1) OVERTON, trad. J. RÉGNIER de, « La Perméabilité en physiologie et pathologie générale », de GELLHORN, p. 787.

(2) HANSTEEN-CRANNER. — Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Lands brukheiskole Kristiana, 2, 1, 1922.

substances ne soient que des modifications d'un même phosphatide. La nécessité où l'on est de concevoir un tel système colloïdal, pour pouvoir expliquer les phénomènes de perméabilité cellulaire, résulte surtout des expériences qui ont été faites sur l'influence qu'exercent les sels sur l'élimination des phosphatides et sur la perméabilité en général.

AUTRES THÉORIES COLLOIDO-CHIMIQUES

Théories de LLOYD et FREE

LLOYD (3) et FREE (4) supposent que le protoplasme ou plutôt la membrane plasmique, se comporte comme un colloïde hydrophile en émulsion, colloïde pour lequel la perméabilité est déterminée par les modifications de la teneur en eau de la phase dispersée. Le gonflement de la phase dispersée diminuerait la perméabilité, par la diminution des voies de diffusion de la phase continue, et le dégonflement agirait de façon inverse.

Théorie de HAYNE (5)

« D'après HAYNE, la membrane plasmique serait constituée par un
« colloïde en émulsion dont le liquide dispersant serait une solution tam-
« ponnée. Les sels et les substances non électrolytes modifieraient la per-
« méabilité en déplaçant le pH de la solution tamponnée. La concentra-
« tion en ions H serait ainsi augmentée par les sels (les cations bivalents
« seraient plus actifs que les chlorures alcalins) et diminuée par les subs-
« tances non conductrices. L'action des sels et celle des substances non
« conductrices varieraient selon la distance séparant le pH du point iso-
« électrique, car, d'après HAYNE, la perméabilité de la membrane plas-
« matique serait maxima au point isoélectrique. Une augmentation de la
« concentration en ions H, provoquée par exemple par les sels, augmen-
« terait donc la perméabilité si le point isoélectrique du colloïde plasma-

(3) LLOYD. — The colloidal properties of protoplasm: Imbibition in relation to growth. *Trans roy. Soc., Canada*, III, 9, 133, 1917.

(4) FREE E.-E. — A colloidal hypothesis of protoplasmic permeability. *Plant World* 21, 141, 1918.

(5) HAYNE D. — The action of salts and non-electrolytes upon buffer solutions and amphoteric electrolytes and the relation of these effects to the permeability of cell. *Biochem J.* 15, 440, 1921.

« tique se trouvait à un pH plus petit que celui de la solution tampon-
« née. »

Théorie de CLOWES (6)

CLOWES (1916-1917) a développé une autre hypothèse basée sur des mécanismes colloïdaux, conditionnant les modifications de la perméabilité. Il a comparé la couche limitante protoplasmique à un colloïde en émulsion, émulsion qui subirait un renversement des phases sous l'influence des facteurs extérieurs.

3° THÉORIE DE L'ADSORPTION

La définition générale de l'adsorption est : « adhésion ou concentration de substances dissoutes contre ou autour d'un corps. »

BECHHOLD et KEINER ont constaté (7) une différence entre la faculté d'adhésion pour les éléments corpusculaires comme les Bactéries et la faculté d'adsorption pour les corps dissous (exemple : les colorants) ; c'est-à-dire, un corps adsorbant peut adsorber fortement les Bactéries mais peut avoir seulement une action faible sur certains colorants et inversement.

Des essais d'adsorption faits avec un charbon en présence de Colibacille, de Staphylocoque et de Bacille paratyphique donnèrent des résultats faibles, mais ces résultats furent bien supérieurs avec du charbon enduit d'argent ou de sel d'argent (7).

GELLHORN pense que la théorie de l'adsorption combinée à l'hypothèse d'une couche limitante colloïdale de phosphatides albumines, se montre capable de nous faire comprendre, aussi bien le mécanisme des modifications de la perméabilité que les différences de la perméabilité, particulièrement en ce qui concerne le passage des substances organiques. Cepen-

(6) CLOWES G.-A.-H. — The action of electrolytes in the formation and inversion of oil-water systems with some biological applications, *J. Physic. Chem.*, 20, 407, 1920.

(7) H. BECHHOLD et L. KEINER. — Vorfragen der Adsorptionstherapie. *Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin*, Band LVI, Heft. 5, p. 543.

dant il reconnaît une difficulté; il a constaté qu'une vitesse de passage plus grande correspond à une adsorption plus vive, mais que d'autre part il existe des substances non adsorbables qui peuvent tout de même passer.

Pour J. RÉGNIER il ne doit pas y avoir, entre les trois grandes théories de la perméabilité, de séparation aussi nette que celle que les promoteurs de ces théories ont admise au début de leurs recherches. « Les travaux « actuels, bien loin de séparer les hypothèses émises tendent donc à les « réunir. » Cependant il constate qu'aucune théorie n'est en mesure d'expliquer tous les phénomènes constatés sur les différentes cellules. « Les théories qui s'appuient sur le plus grand nombre d'expériences, la « théorie lipodique et la théorie de l'adsorption n'ont pas été encore « elles-mêmes soumises à un contrôle indiscutable. » Il n'est donc pas possible encore de porter sur elles un jugement définitif. J. RÉGNIER pense, en définitive, que la perméabilité des cellules « s'explique par une « théorie qui unit l'ultra-filtration à l'adsorption ».

CHAPITRE VII

Application de l'étude de la perméabilité à l'essai d'explication des résultats obtenus au cours des précédentes expériences

Il semble qu'il faille séparer les deux cas suivants :

La perméabilité aux sels d'argent d'une Bactérie vivante ;
— — — — — Bactérie morte.

1° PERMÉABILITÉ D'UNE BACTÉRIE VIVANTE

Sans pouvoir comparer aux Bactéries les expériences faites par de nombreux auteurs, tant sur des cellules animales que sur des cellules végétales, nous pouvons cependant rappeler les faits généraux, c'est-à-dire la très faible perméabilité généralement reconnue aux sels, particulièrement aux sels d'Ag. Nous pouvons cependant admettre l'influence de facteurs extérieurs : température, lumière, pression osmotique, durée d'imprégnation, ce qui explique l'inconstance des résultats et l'« Ag-négativisme » à peu près constant des Bactéries traitées à l'imprégnation argentique selon NYFELDT. Cependant il existe de nombreuses méthodes d'imprégnation argentique où l'Ag pénètre correctement dans les Bactéries vivantes avant la fixation. Il semble que le traitement précédant l'imprégnation argentique ait exercé une influence décisive sur cette imprégnation (méthode de fixation, emploi d'un mordant). Il faudrait donc en conclure que lorsqu'il y a imprégnation correcte d'Ag, il y a altération de la membrane, donc il ne pourrait pas s'agir de perméabilité proprement dite, mais de pénétration dans une cellule dont la membrane est altérée ou d'adsorption.

Dans le cas particulier de la méthode de NYFELDT, les Bactéries, avant leur imprégnation dans une solution de $\text{NO}^3 \text{ Ag}$, n'ont subi aucune

autre opération que le fixage à la chaleur. Leur imperméabilité à peu près complète s'explique par la coagulation.

2° PERMÉABILITÉ D'UNE BACTÉRIE MORTE

A ce sujet rappelons l'affirmation de HOEBER (1) concernant la modification de cellules en contact prolongé avec des sels, modification se manifestant par des lésions, puis par la mort de l'élément :

« Ces phénomènes de lésion se traduisent par une perméabilité croissante des cellules. L'imperméabilité relative pour les sels est donc caractéristique de l'intégrité de la cellule. Elle ne s'observe jamais pour une cellule lésée ou morte. »

Il semble donc que pour une Bactérie morte, il ne s'agit plus de perméabilité de membrane, mais d'altération de celle-ci.

La théorie d'adsorption suffirait à expliquer la différenciation de Bactéries vivantes et mortes par la méthode de NYFELDT.

Il faudrait supposer que cette adsorption ne pourrait avoir lieu qu'avec des Bactéries mortes ou des débris de Bactéries et serait nulle avec les Bactéries vivantes. Le pouvoir d'adsorption semblant venir de l'argent seulement, il faudrait donc admettre que les Bactéries vivantes n'ont pas été imprégnées de solution argentique, ce qui est conforme aux expériences de perméabilité concernant les sels et que, pour les Bactéries mortes, il n'y a pas eu véritablement pénétration des sels d'Ag par perméabilité, mais par altération de la membrane.

Dans le cas des expériences faites avec des émulsions microbiennes mortes ou vivantes, sur une plaque photographique, il ne peut s'agir de pénétration des sels d'Ag dans les cellules, puisque les sels d'Ag sont fixés sur la plaque photographique, mais plutôt de sortie de protoplasme des cellules mortes (ce qui est vraisemblable puisqu'il y aurait altération de la membrane) et action des substances réductrices de celle-ci sur l'argent de la plaque photographique. Ce qui semble confirmer cette hypothèse, c'est l'action nettement réductrice d'une émulsion d'une vieille culture alors que la lyse des Bactéries est complète et qu'il ne s'agit donc plus de cellules normalement constituées, mais uniquement de protoplasme diffus ou de produits de déchet de ces Bactéries.

(1) HOEBER. — *Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe* 6, Aufl. Leipzig, 1926.

CHAPITRE VIII

Essai d'imprégnation argentique de germes soumis aux Rayons U. V. ou aux Rayons X

J'ai utilisé une souche de Staphylocoque doré. Mis en culture sur gélose inclinée pendant 30 heures à 38° C., j'ai obtenu un développement très abondant, résultat recherché pour me permettre d'obtenir une quantité suffisante d'émulsion microbienne. J'ai réalisé des préparations dans de l'eau distillée et procédé à la stérilisation par les procédés habituels : par la chaleur, par un antiseptique chimique, en l'occurrence l'iode, mais aussi par des rayons.

ACTION DES RAYONS U. V.

Précédemment, j'avais été en effet amené à envisager l'action des gouttelettes d'émulsion microbiennes, tuées ou vivantes, sur l'argent d'une plaque photographique et les résultats obtenus m'avaient paru beaucoup plus intéressants que par une simple imprégnation de solution de nitrate d'argent à 5 % ; en observant ultérieurement la reproduction directe et surtout l'agrandissement photographique de quelques-uns des étalements, je me suis demandé si les réductions obtenues sur plaque photographique ne seraient pas produites ou modifiées par une propriété radiante des germes ou simplement les propriétés chimiques de l'agent stérilisateur. J'ai pensé alors qu'il pourrait être intéressant de soumettre les germes étudiés à l'action des rayons ultra-violet et à celle des rayons X. L'action des rayons ultra-violet m'intéressait particulièrement ; elle me permettait d'obtenir la stérilisation de l'émulsion microbienne, sans faire intervenir, ni un antiseptique chimique dont l'action sur le nitrate d'argent pouvait être une cause d'erreur, ni un procédé physique comme la chaleur, dont l'action brutale était capable de modifier la constitution des germes, leur

perméabilité ou leur cohésion (comme l'action de la chaleur à 80° C. me le laissait supposer). Les rayons ultra-violets sont entièrement bactéricides. Les bacilles les plus résistants sont détruits en 5 à 20 secondes. Cette action semble due au fait que les rayons ultra-violets s'opposent à la nutrition des cellules. La rapidité de destruction est fonction du voltage, mais aussi de la limpidité du liquide. Si le liquide est trouble, il faut réduire son épaisseur pour le soumettre à la lampe de quartz, c'est ainsi qu'il faut opérer sur une nappe liquide ayant à peine un centimètre d'épaisseur. J'ai donc réservé une portion de l'émulsion de Staphylocoque, portion que j'ai diluée un peu plus, de façon à diminuer un peu l'opacité de l'émulsion et permettre ainsi une meilleure pénétration des rayons ultra-violets. Cette émulsion versée dans une boîte de Pétri jusqu'à une épaisseur d'environ 2 millimètres, puis placée **ouverte**, au-dessous de la lampe de quartz génératrice des rayons ultra-violets. Pendant toute la durée de l'irradiation j'ai balancé légèrement la boîte de Pétri, de façon à renouveler la partie de l'émulsion de surface, celle qui est la mieux imprégnée de ces rayons et avoir une stérilisation régulière et totale. J'ai fait durer cette expérience pendant 15 minutes, après quoi les Staphylocoques étaient tous tués, comme me l'a montré une culture sur gélose de cette émulsion; culture qui, après 24 heures d'étuve à 37° C. ne donna aucune reproduction de Staphylocoque.

ACTION DES RAYONS X

J'ai essayé de mettre en évidence l'action des rayons X sur l'imprégnation argentique et dans le cas particulier des essais sur plaque photographique. L'émulsion de Staphylocoque préparée de la même façon que celle réservée à l'action aux rayons ultra-violets, fut mise dans un tube à essai en verre. Ce tube fixé à un support fut mis face à une lampe à rayons X à une distance de 30 cm. et soumise à l'action de ces rayons pendant une durée de 5 minutes. Je n'avais pas la prétention de tuer les Bactéries en opérant ainsi (en effet l'émulsion pouvait se reproduire sur un milieu de culture, en l'occurrence la gélose inclinée) ce n'était d'ailleurs pas le résultat cherché.

Dans ces deux cas d'irradiation, après étalement et imprégnation à l'argent, puis développement, de même que par action directe de cette émulsion sur plaque photographique ensuite développée, je n'ai obtenu aucune réduction.

CONCLUSIONS GENERALES

1° Dans mes expériences, les Bactéries vivantes, ont été généralement « Ag-négatives ».

2° Les corps bactériens ont été mis en suspension dans des liquides dispersifs variés; quel que soit ce liquide utilisé, j'ai obtenu sensiblement les mêmes résultats.

3° Les plastides bactériennes ont été soumises à des fixateurs différents; là encore la nature du fixateur n'a pas influencé les résultats.

4° Des Bactéries tuées, et cela par n'importe quel procédé auquel j'ai eu recours, n'ont pas présenté d' « Ag-positivisme ».

5° Une exception doit être faite en faveur de la température de 100° C.; dans ce cas, les Bactéries sont « Ag-positives », dans la proportion d'environ 30 %.

6° Avec certains germes, la stérilisation par l'iode ou par l'eau oxygénée fait baisser le pourcentage de Bactéries « Ag-positives » à 5 % environ.

7° L' « Ag-positivisme » fut le plus constant pour les Bactéries peptisées, provenant de vieilles cultures et n'ayant plus leur constitution normale.

8° Les résultats furent identiques quelques soient la température et la durée des différentes opérations.

9° Je vais essayer d'expliquer pourquoi ma conclusion est en contradiction avec celle de NYFELDT? Les procédés de stérilisation utilisés par cet auteur sont très actifs et leur action est très prolongée (10 minutes à l'autoclave, 24 heures dans du formol, des vapeurs d'éther, de l'oxydol ou du sublimé). Ces procédés ont probablement altéré sensiblement la membrane, ce qui semble confirmer mon opinion: l' « Ag-positivisme » est dû plutôt à l'altération de la membrane qu'à la mort de la plastide.

10° Dans l'état actuel de la technique, il me semble impossible de différencier les Bactéries vivantes et mortes par la méthode de NYFELDT. Cette affirmation ne préjuge en rien des perfectionnements à apporter ultérieurement à la méthode et des services qu'elle pourra rendre au Microbiologiste qui est quelques fois bien embarrassé pour décider si une Bactérie est morte ou vivante avant la fixation.

—:—

VU :

Nancy, le 15 décembre 1938.

Le Président de thèse,

Ph. LASSEUR.

VU ET APPROUVÉ :

Nancy, le 17 décembre 1938.

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

PASTUREAU.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Nancy, le 23 décembre 1938.

Le Recteur de l'Académie,

BRUNTZ.

Président du Conseil de l'Université.

Table des Matières

INTRODUCTION. — Expériences de NYFELDT et de CEDERKREUTZ.....	9
---	---

CHAPITRE I

Généralités sur les méthodes d'imprégnation argentine.....	15
--	----

CHAPITRE II

Reproduction des expériences de NYFELDT. — Généralités.....	23
---	----

CHAPITRE III

Résultats détaillés de mes expériences personnelles.....	31
--	----

CHAPITRE IV

Essais sur plaques photographiques	57
--	----

CHAPITRE V

Notions sommaires sur la perméabilité de la membrane.....	67
---	----

CHAPITRE VI

Théories de la perméabilité	73
-----------------------------------	----

CHAPITRE VII

Application de l'étude de la perméabilité à l'essai d'explication des résultats obtenus au cours des précédentes expériences.....	77
---	----

CHAPITRE VIII

Essai d'imprégnation argentine de germes soumis aux Rayons U, V. ou aux Rayons X	79
--	----

CONCLUSIONS GÉNÉRALES	81
---------------------------------	----
